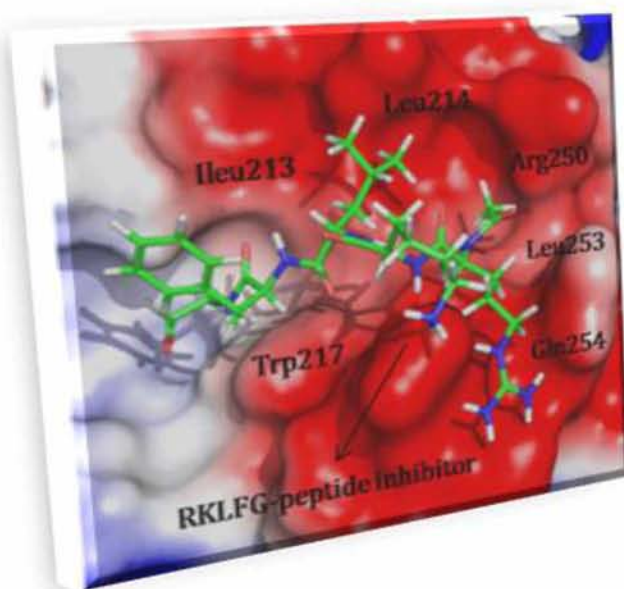


ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

**ΝΙΚΟΛΟΠΟΥΛΟΣ ΒΑΙΟΣ**

**“Έκφραση και Απομόνωση της Ανασυνδυασμένης  
Πρωτεΐνης Cyclin A του Ανθρώπου στην *Escherichia coli*  
και Χαρακτηρισμός της με Πιθανούς  
Αναστολείς”**



PROTEIN  
BIOCHEMISTRY

C  
G  
G  
T  
A  
T  
A  
G  
C  
C  
A  
G  
T  
A

**ΛΑΡΙΣΑ 2014**

**“Έκφραση και Απομόνωση της Ανασυνδυασμένης Πρωτεΐνης Cyclin A του Ανθρώπου στην *Escherichia coli* και Χαρακτηρισμός της με Πιθανούς Αναστολείς”**

**“Expression and Purification of Recombinant Human Cyclin A Construct in *Escherichia coli* and Characterization with Putative Inhibitors”**

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Λάρισας καθώς και στο Εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Κτηνιατρικής Καρδίτσας, στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**Υπεύθυνος Καθηγητής:**

**Δημήτριος Δ. Λεωνίδας**, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Τριμελής Επιτροπή:**

**Δημήτριος Δ. Λεωνίδας**, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Λάρισας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Γεώργιος Κοντοπίδης**, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, του τμήματος Κτηνιατρικής Καρδίτσας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Άννα-Μαρία Ψαρρά**, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Λάρισας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες,

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω την τριμελή επιτροπή για την εμπιστοσύνη στην επιλογή και την ανάθεση του θέματος της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Ιδιαίτερος να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Δημήτρη Δ. Λεωνίδα (Αναπληρωτή Καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας) και τον κ. Γεώργιο Κοντοπίδη (Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας του τμήματος Κτηνιατρικής Καρδίτσας) για την αμέριστη βοήθεια και τις συμβουλές τους που ήταν πολύτιμες για την διεκπεραίωση της εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Μεταδιδακτορικό Ερευνητή και φίλο Αστέρη Γρηγορούδη, για την άψογη συνεργασία και καθοδήγηση για την ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας. Επίσης και όλο το προσωπικό του εργαστηρίου της Βιοχημείας της Κτηνιατρικής Καρδίτσας, τον Μεταδιδακτορικό Ερευνητή Χρίστο Παπανεοφύτου για τη πολύτιμη υποστήριξή του και τις υποψήφιες Διδάκτορες Μάγδα Ροβολή και Ανθή Μέττου για την βοήθεια και τη συνεργασία για τη δημιουργία ενός φιλικού κλίματος. Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω και τους υποψήφιους Διδάκτορες Δήμητρα Χατζηλεοντιάδου, Αναστασία Καντσάδη και Γεώργιο Στραβοδήμο του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για τις πολύτιμες υποδείξεις τους για την περάτωση της διπλωματικής.

## ΠΕΡΙΧΟΜΕΝΑ

|  |    |
|--|----|
| <b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>  | 7  |
| <b>ABSTRACT</b>  | 8  |
| <b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>  | 9  |
| 1. Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου   | 9  |
| 2. Κυκλίνες (Cyclins)  | 12 |
| 3. Η Κυκλίνη A (Cyclin A, CCNA)  | 17 |
| 4. Μοριακή βάση του καρκίνου   | 20 |
| 5. Αναστολείς CCNs-CDKs, CKIs (Cyclin Dependent Kinase Inhibitors)   | 23 |
| 6. Στοχευμένη ανάπτυξη φαρμακευτικών ΟΥΣΙΩΝ – Στρατηγικές αναστολής CCNA –<br>REPLACE STRATEGY ( <u>R</u> eplacement with <u>P</u> artial <u>L</u> igand <u>A</u> lternatives through <u>C</u> omputational<br><u>E</u> nrichment) | 24 |
| 7. Σκοπός της εργασίας – πειραματικές παράμετροι   | 29 |
| 8. Επιλογή κατάλληλου φορέα κλωνοποίησης και βακτηριακού στελέχους   | 30 |
| 9. Σωματίδια εγκλεισμού (Inclusion Bodies)   | 33 |
| 10. Διαδικασίες για τη λύση των βακτηρίων και σωματιδίων εγκλεισμού  | 34 |
| 11. Αναδίπλωση πρωτεϊνών (Refolding)   | 35 |
| 12. Απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών - Χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου<br>μέταλλου (Affinity Chromatography) – Ιοντοανταλλαγής (Ion Exchange Chromatography)  | 37 |
| 13. Τίτλοδοτηση με φασματοσκοπία φθορισμού (Fluorescence Titration)  | 38 |
| <b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>   | 39 |
| 1. Επιλογή τμήματος της CCNA2 και κατάλληλου βέκτορα   | 39 |
| 2. Θρεπτικά υλικά  | 42 |
| 3. Προετοιμασία & μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων (Competent Cells) <i>E. coli</i> με την<br>δοκιμασία CaCl <sub>2</sub>  | 43 |
| 4. Μέθοδοι προσδιορισμού πρωτεϊνών   | 46 |
| 5. Έλεγχος εισόδου του πλασμιδίου με τη CCNA2  | 50 |
| 6. Ανάλυση και έλεγχος διαλυτότητας της CCNA2  | 50 |
| 7. Επαγωγή της έκφρασης της CCNA2  | 51 |
| 8. Λύση κυττάρων και σωματιδιακών εγκλειστών. Συλλογή και ανάκτηση της πρωτεΐνης   | 52 |
| 9. Αναδίπλωση της πρωτεΐνης (Refolding)  | 52 |
| 10. Απομόνωση της πρωτεΐνης μέσω χρωματογραφίας συγγένειας   | 52 |

|  |           |
|--|-----------|
| 11. Μελέτες σύνδεσης πρωτεΐνης-αναστολέα και μέτρηση μέσω τιτλοδότησης με φασματοσκοπία φθορισμού.....                             | 53        |
| <b>ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ.....</b>  | <b>54</b> |
| 1. Ανάλυση έκφρασης και διαλυτότητας της CCNA2.....  | 54        |
| 2. Λύση των κυττάρων - εφαρμογές καθαρισμού και αποδιάταξης των σωματιδιακών εγκλείστων για την ανάκτηση της CCNA2.....            | 56        |
| 3. Στρατηγικές αναδίπλωσης (Refolding Strategies).....   | 58        |
| <i>a. TCA/Acetone κατακρήμνιση.....</i>  | <i>59</i> |
| 4. Καθαρισμός και απομόνωση της CCNA2.....   | 60        |
| 5. Προσδιορισμός της σταθεράς διάστασης (kd) μέσω μέτρησης με φασματοσκοπία φθορισμού της ενεργότητας δέσμευσης της Cyclin A2..... | 61        |
| <b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>   | <b>63</b> |
| 1. Έλεγχος για επιτυχή μετασχηματισμό και εισαγωγής του ανασυνδυσμένου πλασμιδίου.....   | 63        |
| 2. Ανάλυση της έκφρασης και της διαλυτότητας της CCNA2.....  | 65        |
| 3. Προσδιορισμός βέλτιστων συνθηκών για την υπερ-έκφραση της ανασυνδυασμένης CCNA2.....  | 66        |
| 4. Στρατηγικές ανάκτησης της CCNA2 από τα σωματίδια εγκλεισμού.....  | 69        |
| 5. Βελτιστοποίηση συνθηκών αναδίπλωσης της CCNA2.....  | 71        |
| 6. Καθαρισμός σε μη αποδιατακτικές συνθήκες της 6xHis-CCNA2 (Native conditions).....   | 74        |
| 7. Διαλυτότητα της 6xHis-CCNA2.....  | 76        |
| 8. Πέψη με TEV πρωτεάση.....   | 76        |
| 9. Φασματοσκοπικές μελέτες φθορισμού.....  | 78        |
| <b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>   | <b>81</b> |
| <b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....</b>  | <b>84</b> |
| <b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>   | <b>91</b> |

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι κινάσες οι εξαρτώμενες από τις κυκλίνες, καθώς και οι συνεργοί ενεργοποίησής τους, οι κυκλίνες, αποτελούν ευρέως διαδεδομένους αντικαρκινικούς στόχους, λόγω του ρυθμιστικού ρόλου τους στον κυτταρικό κύκλο. Στην εργασία αυτή επιχειρούμε την υπερέκφραση τμήματος της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης Cyclin A (CCNA2, CA2), αναζητώντας εκείνα τα επίπεδα απόδοσης και καθαρότητας που απαιτούνται στην προσπάθειά μας για κρυστάλλωση με πιθανούς αναστολείς. Το τμήμα της CCNA2 με την αλληλουχία αμινοξέων 174-432 κλωνοποιήθηκε από το αντίστοιχο cDNA σε κατάλληλο βακτηριακό φορέα. Το παραπάνω τμήμα της πρωτεΐνης επιλέχτηκε γιατί παρουσιάζει αυξημένη σταθερότητα σε σχέση με την πλήρη αλληλουχία και ταυτοχρονα περιέχει την περιοχή πρόσδεσης με την κινάση όπως και την περιοχή πρόσδεσης με το υπόστρωμα. Κατά την εξέταση διάφορων μεταβλητών, όπως διάφορων *E. coli* κυττάρων ξενιστών, θερμοκρασίας και συγκεντρώσεων επαγωγέα, καθορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες για την έκφραση της σημασμένης πρωτεΐνης με ουρά έξι ιστιδινών. Κύρια κατεύθυνση της εργασίας αποτελεί η εφαρμογή στρατηγικών για την απόκτηση διαλυτής, αναδιπλωμένης και βιολογικά ενεργής πρωτεΐνης. Μετά την υπερέκφραση στα κύτταρα *E. coli* και την ανάκτησή της από τα σωματίδια εγκλεισμού, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη καθαρίζεται μέσα από πολλαπλά βήματα, στοχεύοντας προς υψηλότερα επίπεδα απόδοσης και καθαρότητας, απαραίτητα για το χαρακτηρισμό με πιθανούς αναστολείς, που έχουν τη μορφή συντιθέμενων πεπτιδίων. Σε τελικό στάδιο επιχειρείται κρυστάλλωση των παραγόμενων προϊόντων κυκλίνης και αναστολέα.

## ABSTRACT

Cyclin-dependent kinases as well as their activation partners, cyclins, have been widely held as anti-cancer targets, due to their regulatory role in cell cycle. In this work we attempt the over-expression and purification of recombinant truncated form of human cyclins A, seeking the high levels of yield and purity required in our attempt to crystallize their complexes with their cell cycle regulatory partners. Truncated Cyclin A<sub>2</sub> (amino acids 174-432) has already been generated from their cDNA and fused to the appropriate bacterial vectors. Due to its stability, the truncated segment 172-432 was selected instead of full sequence. In addition, the segment consists of both substrate and binding site of cyclin A in order to be activated with the appropriate cdks. The attempt to obtain soluble, His-tagged forms after expression in *E. coli* cultures will be the major objective during the course of this work, following by methods to retain their stability.

Following over-expression in *E. coli* cells, the recombinant proteins will be purified, via multiple steps, towards higher yield and purity and will be characterized with putative inhibitors in the form of existing synthesized peptides. Finally, crystallization attempts of the resulting Cyclin-Inhibitor complex products will also take place.



# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## **1. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ**

Οι διαδοχικές διεργασίες που συμβαίνουν στο κύτταρο, από την εμφάνισή του μέχρι τη στιγμή της διαίρεσής του σε νέα θυγατρικά κύτταρα, ονομάζονται κύκλος ζωής του κυττάρου ή κυτταρικός κύκλος. Κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου επιτελούνται διάφορες διεργασίες εκ των οποίων οι πιο σημαντικές αφορούν στην κυτταρική αύξηση και ανάπτυξη, την αντιγραφή του DNA, την κατανομή και προσανατολισμό των διπλασιασμένων χρωμοσωμάτων για τα νέα θυγατρικά κύτταρα και την κυτταρική διαίρεση. Οι διεργασίες αυτές χωρίζονται σε στάδια που είναι η μεσόφαση, η οποία διακρίνεται σε τρεις επιμέρους φάσεις την G1, την S και την G2 και η πυρηνοδιαίρεση (M) όπου και καταλήγουν στη κυτταρική διαίρεση (**κυτταροκίνηση**, cytokinesis). Η διαδοχή  $G1 \rightarrow S \rightarrow G2 \rightarrow M \rightarrow G1$  αποτελεί και τον **κυτταρικό κύκλο**.

Κατά την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, η διαδικασία της μετάβασης από τη μία φάση στην επόμενη, ελέγχεται από ένα συντηρημένο ρυθμιστικό μηχανισμό κατά τον οποίο συντονίζεται η ροή των γεγονότων του κυτταρικού κύκλου που επιπλέον εμπλέκει τον κυτταρικό κύκλο με εξωκυτταρικά σήματα/ερεθίσματα που ελέγχουν κυτταρικές αποκρίσεις όπως η ανάπτυξη, ο πολλαπλασιασμός ή ακόμη σε περιπτώσεις και την απόπτωση. Εν αντιθέσει με τον συνεχή πολλαπλασιασμό εμβρυϊκών κυττάρων, σε άλλα διαφοροποιημένα κύτταρα και ιστούς (π.χ. τα νευρικά

κύτταρα) επέρχεται η οριστική παύση διαίρεσης ενώ άλλα κύτταρα διαιρούνται κατά περίπτωση.

Ρυθμιστικά γονίδια εμπλέκονται στις διαδικασίες αυτές και μπορούν να διακριθούν σε:

**α)** γονίδια που ασκούν τον έλεγχο μετάβασης από την μία φάση στην επόμενη του κυτταρικού κύκλου,

**β)** γονίδια που οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν τροποποιούν τη δράση των γονιδίων ή των προϊόντων των γονιδίων της προηγούμενης ομάδας και

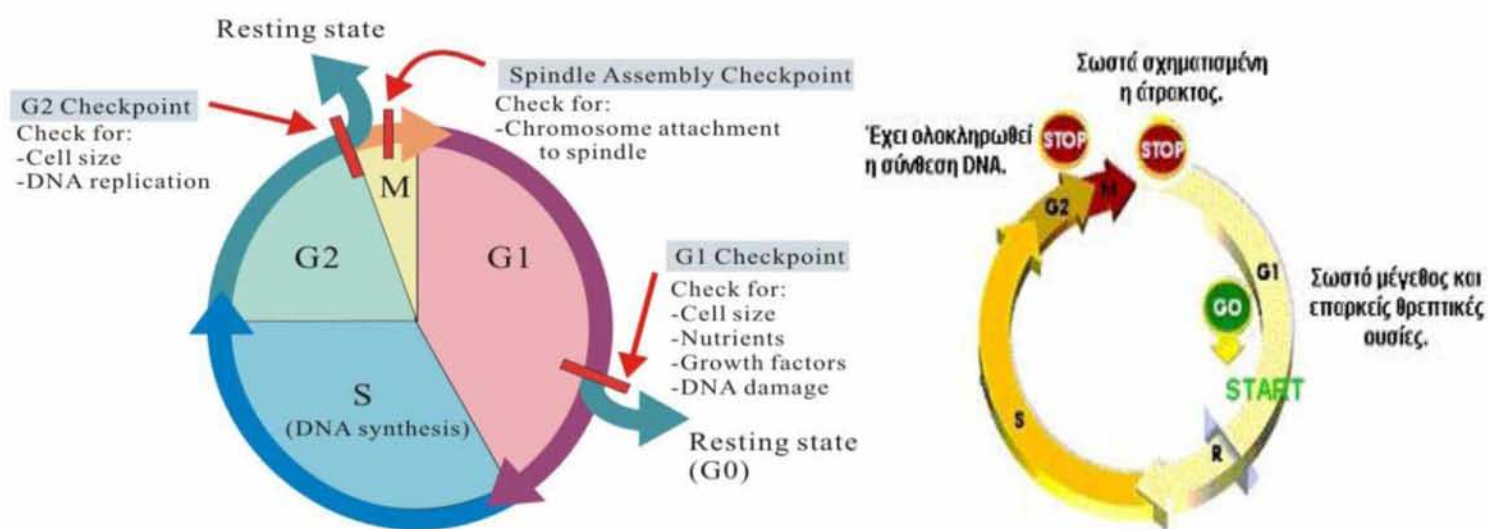
**γ)** γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα και άλλους παράγοντες για την συνέχιση των απαραίτητων λειτουργιών του κυττάρου, όπως η αντιγραφή του DNA.

Στα κύτταρα των ευκαρυωτικών οργανισμών, η ροή του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζεται από μια σειρά πρωτεϊνικών **κινασών** οι οποίες εμφανίζονται συντηρημένες σε ολόκληρο το φάσμα των ευκαρυωτικών οργανισμών. Κύριο ρόλο ρύθμισης του μηχανισμού αυτού αποτελούν και οι αυξητικοί παράγοντες οι οποίοι ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, συντονίζοντας τη διαίρεση των μεμονωμένων κυττάρων με τις ανάγκες του οργανισμού ως σύνολο.

Ο συντονισμός και η διαδοχική μετάβαση των φάσεων, επιτυγχάνεται από μια σειρά σημείων, τα **Σημεία Ελέγχου του Κυτταρικού Κύκλου (cell cycle checkpoints)** <sup>1</sup> που εμποδίζουν την μετάβαση σε επόμενη φάση εάν δεν έχουν ολοκληρωθεί οι διεργασίες της προηγούμενης φάσης. Στα περισσότερα ζωικά κύτταρα, το πρώτο και σημαντικό σημείο ελέγχου προς το τέλος της φάσης G1, για την “τύχη” του κυττάρου είναι το σημείο **R (restriction point - σημείο περιορισμού)**. Η ρύθμιση από εξωκυτταρικούς αυξητικούς παράγοντες στα ζωικά κύτταρα, επάγει την πρόοδο του κύκλου του κυττάρου. Κύτταρα όπως οι ινοβλάστες του δέρματος παραμένουν στη φάση G0 και ενεργοποιούνται προάγοντας τον

κύκλο από τον αυξητικό παράγοντα των αιμοπεταλίων PDGF (Platelet Derived Growth Factor) για την επούλωση κάποιου τραύματος. Το σημείο R ονομάζεται και START από το ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* από τον ταυτοποιήθηκε πρώτη φορά. Χαρακτηρήστηκε ως σημείο λήψης απόφασης του κυττάρου, όπου προσδιορίζεται, εάν υπάρχουν τα διαθέσιμα θρεπτικά, το επαρκές μέγεθος του κυττάρου καθώς και οι συνθήκες για την ολοκλήρωση των επόμενων φάσεων του κυτταρικού κύκλου.

Άλλα σημεία ελέγχου είναι το **σημείο ελέγχου βλαβών στο DNA** (DNA damage checkpoints) που αποτρέπει την αντιγραφή του DNA στην περίπτωση που φέρει βλάβες, ώστε να αποφευχθεί η μεταβίβασή τους στα θυγατρικά κύτταρα αλλά και το **σημείο ελέγχου συγκρότησης της ατράκτου** (spindle assembly checkpoint), το οποίο ελέγχει τη στοίχιση των χρωμοσωμάτων στη μιτωτική άτρακτο ώστε να εξασφαλιστεί ο ακριβής διαχωρισμός και κατανομή των χρωμοσωμάτων σε κάθε νέο θυγατρικό κύτταρο. Η αποτυχία κατά τον έλεγχο σε ένα σημείο προκαλεί τη στάση του κύκλου στο σημείο αυτό.



Εικόνα 1. Σημεία ελέγχου ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου.

## 2. KYKΛΙΝΕΣ (Cyclins)

Η μοριακή βάση του ελέγχου της ρυθμιστικής διαδικασίας του κυτταρικού κύκλου, εξασφαλίζεται μέσω των κυκλινών (*Nobel Prize in Physiology for 2001*), που είναι ομάδα πρωτεϊνών των οποίων ο κύριος και χαρακτηριστικός τους ρόλος είναι η σύνδεσή τους και η ενεργοποίηση ως σύμπλοκα με τα μέλη της οικογένειας των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (cyclin dependent kinases: Cdk)<sup>2, 3</sup>. Χαρακτηριστικό των κυκλινών κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου είναι η ποσοτική μεταβολή που εμφανίζουν στη συγκέντρωσή τους, έχοντας ως αποτέλεσμα την μεταβολή της δράσης της αντίστοιχης κινάσης CDK με την οποία συνδέεται η κάθε κυκλίνη. Αυτή η μεταβολή στην έκφραση των γονιδίων των κυκλινών καθώς και η πρωτεόλυσή τους ανάλογα της φάσης του κύκλου, αποτελούν τρόπον τινά, τη βάση του μηχανισμού ελέγχου του κυτταρικού κύκλου<sup>4</sup>. Αυτή η μεταβολή της συγκέντρωσης χωρίζει τις κυκλίνες σε δύο τάξεις με βάση τη σταθερότητά τους:

Στη πρώτη υπάγονται οι κυκλίνες που είναι ασταθείς καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και με τη συγκέντρωσή τους να καθορίζεται από το ρυθμό μεταγραφής και το ρυθμό καταστροφή τους (αστάθεια) από το πρωτεόσωμα ενώ,

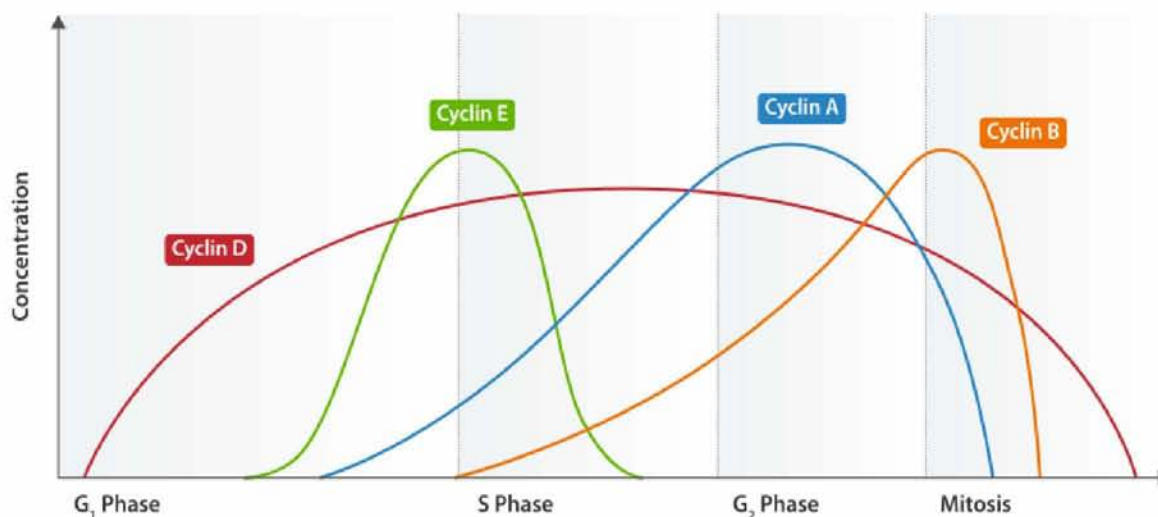
στη δεύτερη ανήκουν αυτές που είναι ασταθείς μόνο κατά τη διάρκεια ορισμένων φάσεων του κυτταρικού κύκλου. Παράδειγμα στα θηλαστικά αποτελούν οι κυκλίνες D και E με χρόνο ζωής μόνο 20 λεπτά. Η αστάθειά τους αυτή υπόκειται στις αλληλουχίες PEST που εντοπίζονται στο καρβοξυτελικό άκρο τους και που όταν απομακρυνθούν έχουν ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση των κυκλινών.

Συνοψίζοντας, η ρύθμιση αποτελεί το συνδυασμό των παρακάτω παραγόντων:

❖ **Κυκλίνες (Cyclins)**, είναι πρωτεΐνες οι οποίες περιέχουν περίπου 400-500 αμινοξέα και μπορούν να διακριθούν στις κυκλίνες A, B, D, E και άλλες. Κάθε κυκλίνη επιτελεί και διαφορετικής φύσης λειτουργίες μέσα στο κυτταρικό κύκλο. Μια ακόμη διάκριση των κυκλινών γίνεται ανάλογα τη φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία δρουν, όπου χωρίζονται ως: G1/S κυκλίνες, S κυκλίνες, M κυκλίνες και G1 κυκλίνες.

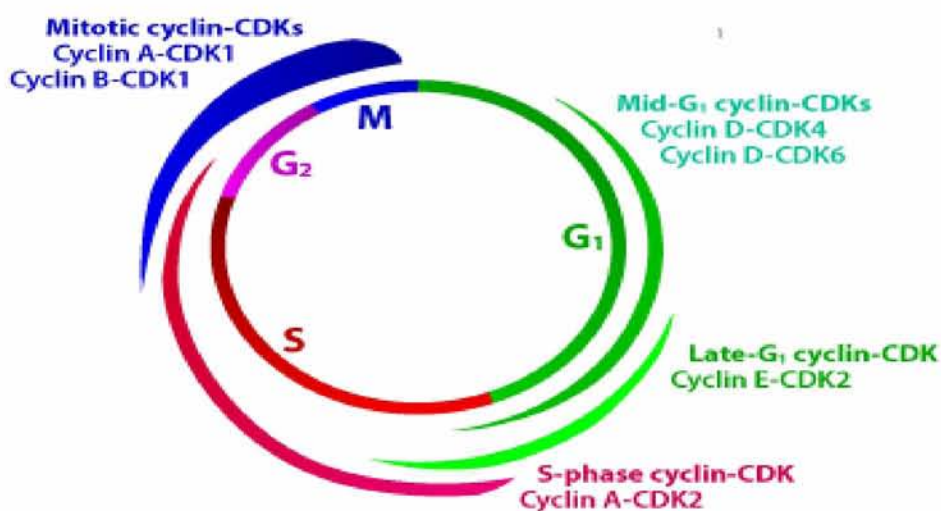
❖ **Κινάσες εξαρτώμενες από τις κυκλίνες (Cyclin Dependent Kinases CDK)**, ως ετεροδιμερή πρωτεϊνικά σύμπλοκα, αποτελούμενα από μια ρυθμιστική, την εκάστοτε κυκλίνη που θα βρεθεί σε αυξημένη συγκέντρωση σε συγκεκριμένο στάδιο στο κυτταρικό κύκλο και μια καταλυτική υπομονάδα, έχοντας δραστηριότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης. Η καταλυτική υπομονάδα (CDK), με ενζυμική ενεργότητα παραμένει ανενεργή μέχρι να συνδεθεί με την αντίστοιχη κυκλίνη. Υπάρχει ποικιλία κινάσεων καθώς και πολλές κυκλίνες όπου η κάθε κυκλίνη μπορεί να ενεργοποιεί περισσότερες από μία CDKs. Το πρώτο σύμπλοκο με μοριακό χαρακτηρισμό Cyclin-CDK που ταυτοποιήθηκε ήταν ο MPF (Maturation Promoting Factor), όπου σε διάφορα εργαστήρια (Lee Hartwell et al. 1970, Yoshio Masui, Clement Markert 1971, Dennis Smith, Robert Ecker 1971, Paul Nurse et al., Tim Hunt et al. 1983 και Joan Ruderman et al. 1986) αποκαλύφθηκε ως συντηρημένος μηχανισμός και ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου αποτελούμενος από τις δύο υπομονάδες: της Cdk1 και την κυκλίνη B.

❖ **Αναστολέων των Cyclin-CDK (CKI, CDK inhibitors),** ως οικογένεια πρωτεϊνών όπου συνδέονται στις CDK ή στο σύμπλεγμα Cyclin-CDK με αναστρέψιμο τρόπο. Διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τις CIP/KIP που αναστέλλουν το σύμπλοκο στη φάση G<sub>1</sub> και τις INK όπου και αναστέλλουν τα συγκεκριμένα συμπλοκα των CDK4 και CDK6.



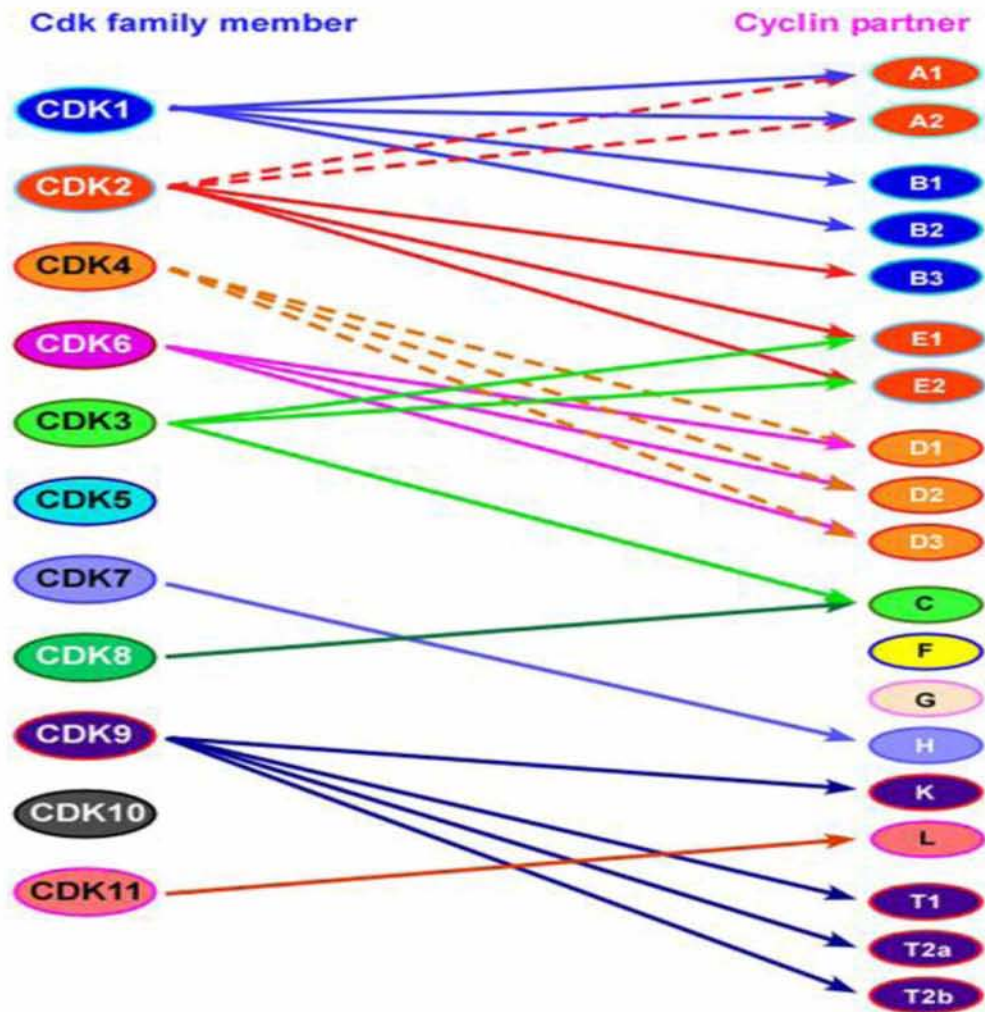
Εικόνα 2. Η μεταβλητή συγκέντρωση των κυκλινών ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου.

### Human Cyclin-CDK Complexes in the Cell Cycle



Εικόνα 3. Η κατανομή του στο κυτταρικό κύκλο σε ανθρώπινο κύτταρο.

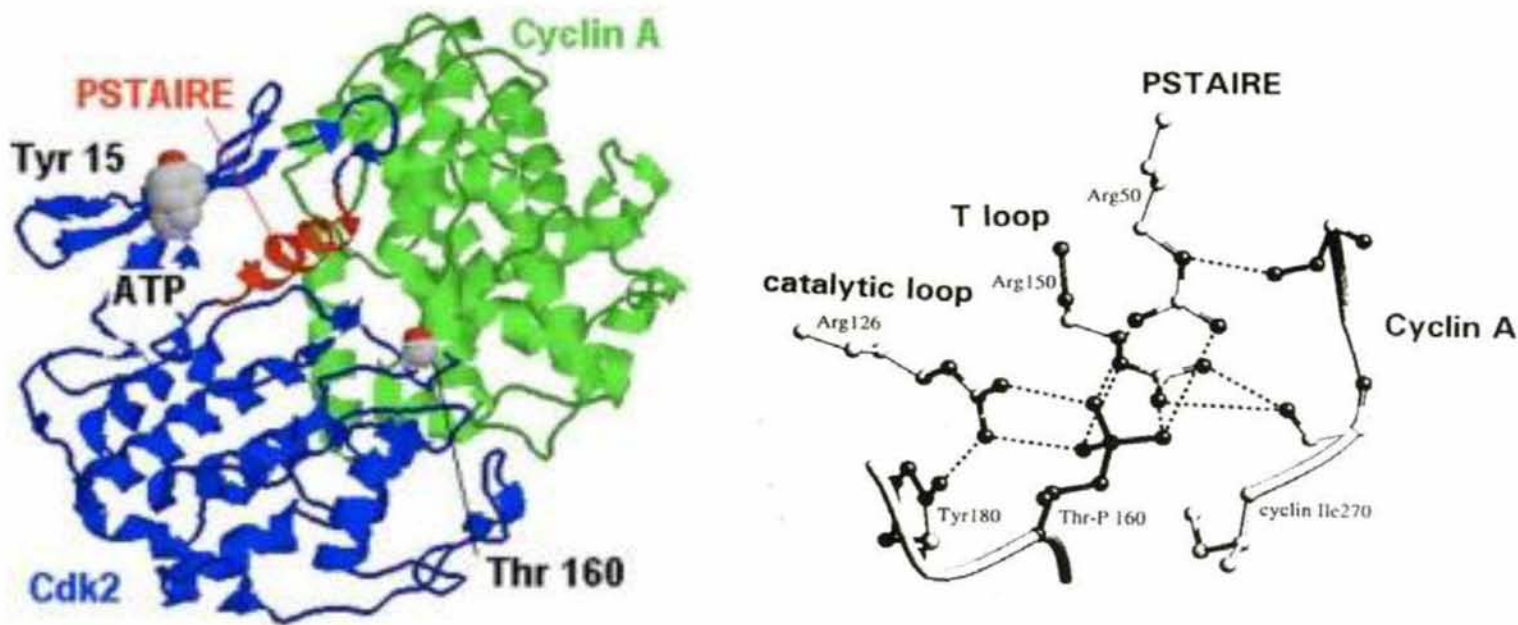




Εικόνα 4. Οι διασυνδέσεις μεταξύ των Κυκλινών και των CDKs<sup>4</sup>.

Ως προς την πρωτοταγή δομή τους, όλες οι κυκλίνες παρουσιάζουν ομοιότητα σε μια περιοχή 100 αμινοξέων που ονομάζεται κουτί κυκλίνης (cyclin box). Η περιοχή αυτή είναι υπεύθυνη για την σύνδεση και ενεργοποίησή τους με τις CDKs. Ωστόσο πέρα από τις όποιες άλλες διαφορές στη πρωτοταγή δομή τους, η τεταρτοταγής δομή τους παρουσιάζει ομοιότητα γνωστή ως κυκλινική πτυχή (cyclin fold). Η κυκλινική πτυχή αποτελείται από ένα πυρήνα με δύο συμπυκνωμένους τομείς πέντε α-ελίκων ο καθένας. Οι πρώτες πέντε έλικες αποτελούν και το κυτίο κυκλίνης. Έξω από την κυκλινική πτυχή (cyclin fold) οι

αλληλουχίες είναι διαχωρισμένες μεταξύ των κυκλινών και το μήκος της αμινοτελικής περιοχής είναι ιδιαίτερος διαφοροποιημένο από κυκλίνη σε κυκλίνη και περιέχει τους τομείς ρύθμισης και στοχοποίησης κάθε κυκλίνης που διαφέρουν ανάλογα με την τάξη της κάθε κυκλίνης<sup>5</sup>.

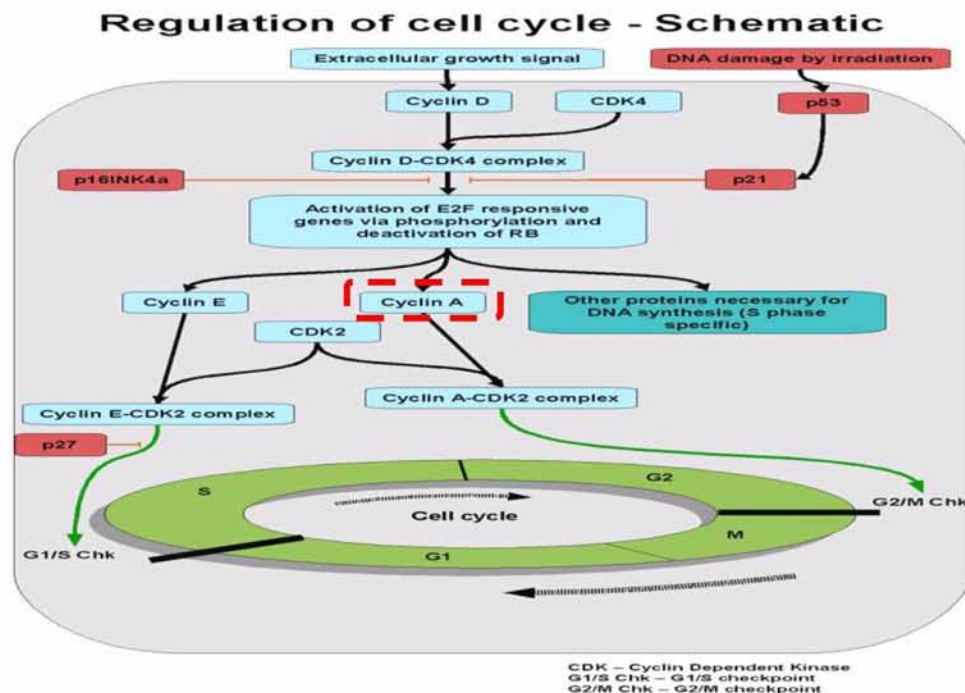


Εικόνα 5. Δομή συμπλόκου CCNA-CDK2 με φωσφορυλιωμένη την θέση Thr160 και συνδεδεμένο ένα μόριο ATP. Με τη φωσφορυλίωση της Thr160 παρατηρείται δραματική αύξηση της δραστηριότητας της κινάσης το οποίο οφείλεται στις διαφορές που προκαλούνται από την πρόσδεση της κυκλίνης σχετίζονται με το καρβοξυτελικό άκρο, την περιοχή T loop και την αλληλεπίδραση κυκλίνης- CDK.



### 3. Η ΚΥΚΛΙΝΗ Α (Cyclin A, CCNA)

Η Cyclin A είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα μεταξύ οικογένειας των κυκλινών επειδή μπορεί να ενεργοποιήσει δύο διαφορετικές κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνες (CDKs) και επεμβαίνει στις λειτουργίες τόσο της S φάσης και στη αρχή της μίτωσης. Παρατηρείται δηλαδή η σύνθεση της Κυκλίνη Α (Cyclin A, CCNA) κατά τη διάρκεια της S και G2 φάσης<sup>6</sup>. Αρκετά σηματοδοτικά μονοπατιών περιλαμβάνουν την Cyclin A, έχοντας ως συνέπεια ρόλο ως ρυθμιστής κλειδί του κυτταρικού κύκλου. Στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς παρατηρούνται δύο τύποι CCNA, η CCNA1 και CCNA2. Ωστόσο η ομολογία μεταξύ των διαφορετικών ειδών ποικίλει και μπορεί να φτάσει ανάμεσα στον άνθρωπο και στον ποντικό στο 44% της ομολογίας. Η CCNA2 παρουσιάζει ομοιότητες στη λειτουργία και με τις άλλες κυκλίνες που είναι ενεργές κατά την διάρκεια που είναι και η ίδια ενεργή καθώς σχηματίζει σύμπλοκα με τις κινάσες CDK1 και CDK2.

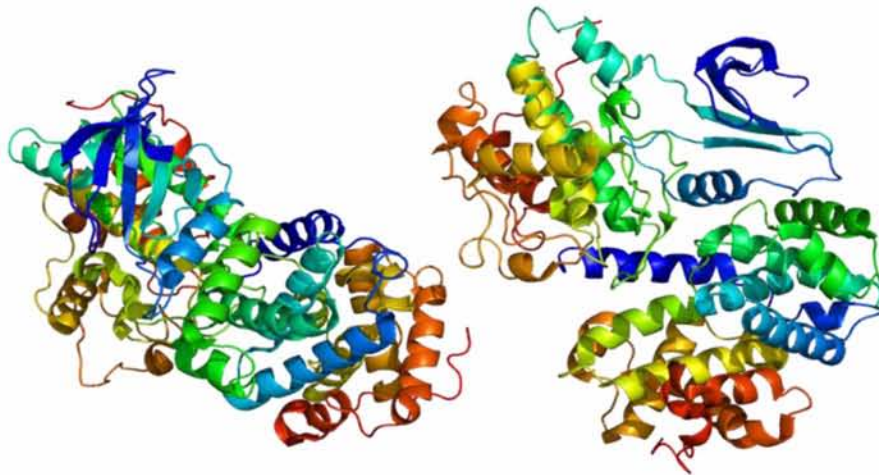


Εικόνα 6. Ένα από τα μονοπάτια δράσης ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, όπου εμπλέκεται η CCNA μετά την ενεργοποίηση του E2F, μέσω φωσφορυλίωσης.

Όπως εμφανίζεται και στη παραπάνω εικόνα, παράδειγμα λειτουργίας του συμπλόκου CCNA2-CDK2 είναι η φωσφορυλίωση *in-vitro* της συγγενής του ρετινοβλαστώματος (Rb) ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p107 <sup>7</sup>. Η έκφραση της CCNA εμφανίζεται να είναι αυξημένη σε πληθώρα νεοπλασιών.

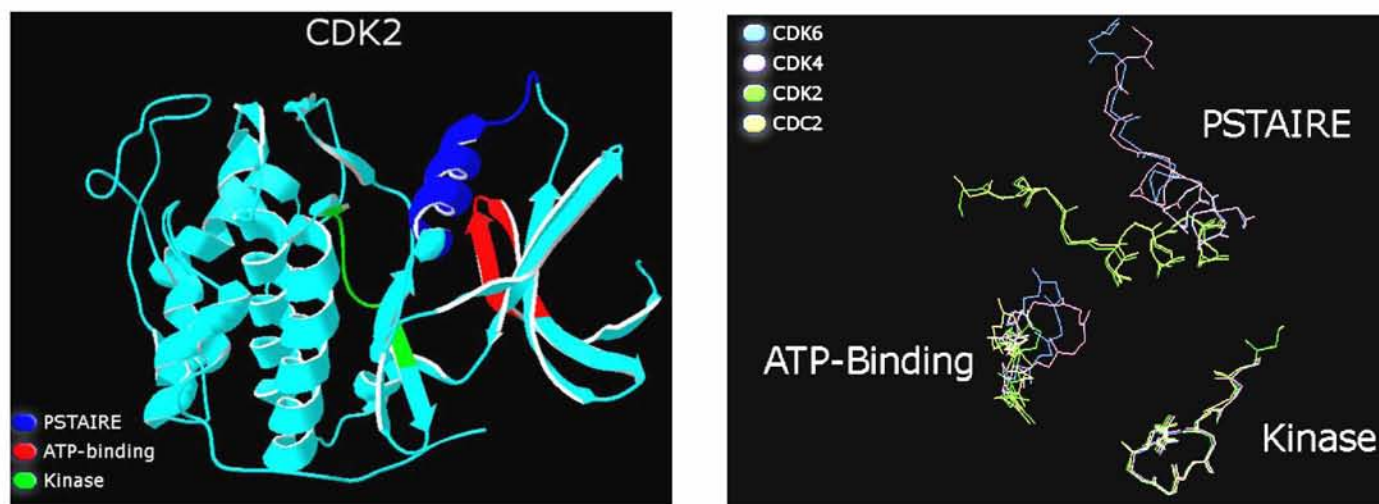
Όταν η CCNA συνδεθεί με την CDK της, η κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση υφίσταται κάποιες δομικές μεταβολές που συνοψίζονται ως εξής:

- Το ενεργό κέντρο επανοργανώνεται ώστε το ATP να μπορεί να προσδεθεί στην ενεργή μορφή της κινάσης.
- Η περιοχή T loop μετακινείται από την καταλυτική περιοχή και η CAK έχει πλέον πρόσβαση για τη φωσφορυλίωση της θρεονίνης.
- Το κουτί κυκλίνης της κυκλίνης A αλληλεπιδρά με την PSTAIRE της CDK και διαλύεται μια έλικα που είχε ανασταλτική δράση. Ακολουθεί μεταφορά του Glu51 στο ενεργό κέντρο για να πάρει μέρος στην κατάλυση <sup>5</sup>.



Εικόνα 7. 3D αναπαράσταση της πρωτεΐνης CCNA. Το σύμπλοκο όπως αυτό εμφανίζεται με την CDK2 στις φάσεις S και G2 του κυτταρικού κύκλου.

Οι μηχανισμοί αυτοί είναι συντηρημένοι με την ύπαρξη ομολογίας και ομοιότητας σε δομή ανάμεσα στις CDKs για τα σημεία ένωσης με τις κυκλίνες.



Εικόνα 8. 3D αναπαράσταση των τομέων σύνδεσης. Εμφανίζεται η ομολογία των περιοχών των CDK1,CDK2,CDK4,CDK6.

Πρόσφατα δείχθηκε ότι ο ανθρώπινος κύτταρο-μεγάλο-ιός (HCMV) έχει εξελιχθεί με ένα μοριακό αισθητήρα για τη δραστηριότητα των CCNA2-CDK, με την γονιδιακή έκφραση των προγραμματισμένων ΙΕ γονιδίων (Immediate Early) να προσαρμόζεται με του ανθρώπινου ξενιστή. Αυτό εμφανίζει την θέση αυτή και σαν δυνητικό στόχο για ανάπτυξη αντι-ιικού φαρμάκου <sup>8</sup>.

Μετά το πέρας του σταδίου και της δράσης των κυκλινών, επέρχεται ο καταβολισμός τους. Το σήμα για την έναρξη της πρωτεόλυσης της κυκλίνης βρίσκεται στο αμινοτελικό της άκρο σε μια περιοχή που ονομάζεται κουτί καταστροφής (destruction box). Η αλληλουχία του σήματος αυτού για τις κυκλίνες Α της G2/M φάσης, ευθύνεται για την σήμανση της κυκλίνης όπου και θα καταβolidστεί από το σύμπλοκο προώθησης της ανάφασης, APC (Anaphase-Promoting Complex) που ονομάζεται και κυκλόσωμα.



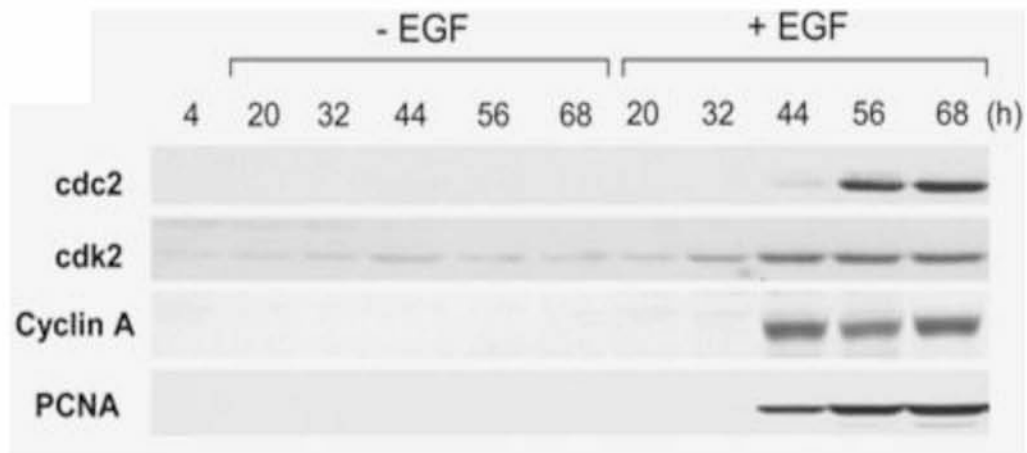
#### 4. ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Στις περισσότερες περιπτώσεις, ο καρκίνος εκδηλώνεται λόγω της συσσώρευσης μιας ποικιλίας μεταλλάξεων σε ένα σωματικό κύτταρο, οι οποίες ενεργοποιούν τα ογκογονίδια και/ή απενεργοποιούν τα ογκοκατασταλτικά. Είναι εμφανές πως και σύμφωνα με τα παραπάνω, μια ελαττωματική ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου μπορεί να είναι η αφορμή για ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό δημιουργώντας όγκους αναπτύσσοντας καρκινικά κύτταρα. Είναι λοιπόν άμεση η συνάφεια των σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στο κυτταρικό κύκλο και του καρκίνου. Ειδικότερα, ο καρκίνος προκαλείται από μη θανατηφόρες μεταλλάξεις στα ογκογονίδια ή/και στα ογκοκατασταλτικά γονίδια, τα οποία ελέγχουν την κυτταρικό κύκλο. Τα ογκογονίδια περιλαμβάνουν τους υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης, οι οποίοι συνδέονται με εξωκυτταρικά σήματα. Οι υποδοχείς αυτοί μετάγουν τα σήματα στο κυτταρόπλασμα και στην συνέχεια στον πυρήνα, όπου ενεργοποιούνται οι παράγοντες, όπως οι κυκλίνες, που εκκινούν την σύνθεση ή την μίτωση του DNA, προωθώντας έτσι την διαίρεση των κυττάρων. Επιπλέον, αναστέλλουν την απόπτωση ή τον αυτοκατευθυνόμενο θάνατο των κυττάρων. Έχουν εντοπιστεί πάνω από 100 ογκογονίδια στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια επιβραδύνουν ή σταματούν την κυτταρική διαίρεση, μέσω παραγόντων οι οποίοι ελέγχουν την μεταγραφή ή την μετάφραση. Συμμετέχουν επίσης στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA και στην προώθηση της απόπτωσης. Έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 30 ογκοκατασταλτικά γονίδια. Στα καρκινικά κύτταρα, οι μεταλλάξεις στα ογκογονίδια είναι συνήθως μεταλλάξεις απόκτησης λειτουργίας (gain of function) που προκύπτουν από την ενίσχυση ή την μετατόπιση περιοχών του DNA που περιέχουν τα γονίδια ή τις ενεργοποιημένες μεταλλάξεις που προκαλούν και προωθούν

την ανώμαλη δραστηριότητα των γονιδίων. Οι μεταλλάξεις στα ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι συνήθως μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας (loss of function), που προκύπτουν μέσω της διαγραφής, της μετατόπισης ή της μετάλλαξης των γονιδίων. Τρία είναι τα είδη των αλλαγών που συμβαίνουν σε ένα κύτταρο, όταν γίνεται ογκογόνο και συνοψίζονται στα εξής: την **αθανατοποίηση** (immortalization) που είναι η ικανότητα για συνεχή και επ' αόριστον ανάπτυξη, τον **μετασχηματισμό** (transformation) που περιγράφει τη διαφυγή από τον έλεγχο των φυσιολογικών ρυθμιστικών περιοριστικών μηχανισμών της ανάπτυξης και τη **μετάσταση** (metastasis) περιγράφει το στάδιο στο οποίο τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να εισβάλουν σε φυσιολογικούς ιστούς διαφορετικούς από αυτόν από τον οποίο προέρχονται και να ιδρύουν νέες δευτερογενείς αποικίες (μεταστατικές εστίες). Τα κύτταρα χάνουν την ικανότητα απόπτωσης, για την οποία φυσιολογικά υπεύθυνο είναι το γονίδιο για τη πρωτεΐνη p53 που μπορεί να κάνει διάγνωση των τυχών βλαβών στο DNA και να ενεργοποιήσει την απόπτωση. Η ανενεργή μορφή της πρωτεΐνης αυτής εμφανίζεται σε περισσότερο από το 50% των καρκίνων<sup>9</sup>. Παρόμοιες καταστάσεις όπως η συντήρηση των τελομερικών ακολουθιών και η διατήρηση της αγγειογένεσης, μηχανισμοί που είναι ισχυρά κατεσταλμένοι στα φυσιολογικά κύτταρα, δίνουν τη δυνατότητα στα κύτταρα να γίνουν καρκινικά και να αυξηθούν οι εστίες δημιουργώντας όγκους δίνοντας ακόμη και μεταστάσεις.

Μια τέτοια υπερ-διέγερση ή υπερ-έκφραση των κυκλινών, δημιουργεί παθολογικές καταστάσεις όπου η συνεχή ενεργοποίησή τους από τις κινάσες τους μέσω της δημιουργίας των συμπλόκων, προωθούν την επιτάχυνση του κύκλου και τη συνεχή διαίρεση των κυττάρων. Τα σήματα των αυξητικών παραγόντων που ενεργοποιούν φυσιολογικά ένα καταρράκτη αντιδράσεων, θα συνεχίσουν να σηματοδοτούν μιτωτικές δράσεις μέσω των κυκλινών και των κινάσεων εξαρτώμενες από τις

κυκλίνες δημιουργώντας τα σύμπλοκα για την προώθηση του πολλαπλασιασμού.

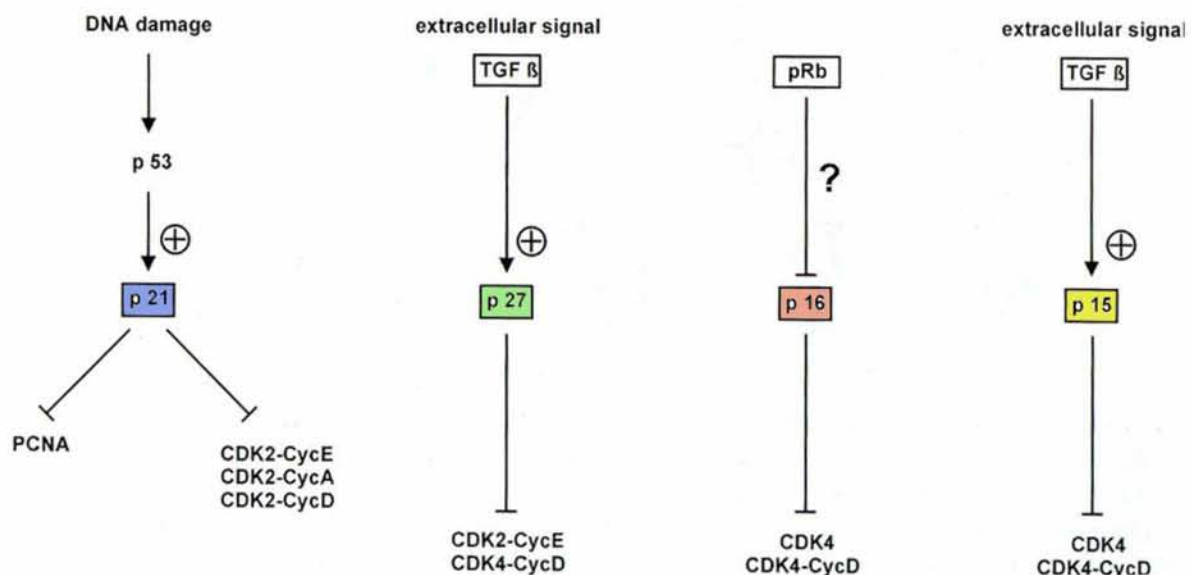


Εικόνα 9. Η έκφραση, μετά από χρονικά διαστήματα, της CCNA, της CDK1, της CDK2, καθώς και του PCNA στην απουσία και παρουσία του EGF (**E**pidermal **G**rowth **F**actor, που είναι αυξητικός παράγοντας και διεγείρει την αύξηση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων συνδεόμενος με τον υποδοχέα EGFR), σε Western Blot ανάλυση μετά από ηλεκτροφόρηση σε 12% SDS-PAGE <sup>10</sup>.

## 5. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ CCNs-CDKs, CKIs (Cyclin Dependent Kinase Inhibitors)

Οι μηχανισμοί που έχουν μελετηθεί, αφορούν στα μόρια εκείνα που συνδέονται στις CDK ή στο σύμπλεγμα CCN-CDK, με τρόπο που μπορεί να αναστραφεί αναστέλλοντας έτσι τη δραστηριότητα των CDK. Στον κυτταρικό κύκλο, οι CKIs αποτελούν σημαντικά σήματα που έχουν με αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Η αναλογία στη συγκέντρωση CKIs/CCN παίζει σπουδαίο ρόλο στο τελικό αποτέλεσμα για τη ρύθμιση του κύκλου.

Όπως έχει αναφερθεί νωρίτερα, ο διαχωρισμός των αναστολέων αυτών γίνεται σε δύο κατηγορίες τις CIP/KIP και τις INK. Παραδείγματα αναστολέων CIP/KIP είναι οι  $p21^{CIP1}$  (CIP1 ή Waf1) και  $p27^{KIP1}$  (KIP1), που δεσμεύονται στη περιοχή που δεσμεύεται το ATP, ενώ για τους INK ο  $p16^{ink4a}$  δεσμεύεται στο σημείο εκείνο που πραγματοποιείται η σύνδεση της CDK6 με την CCND<sup>11</sup>.



Εικόνα 10. Σηματοδοτικά μονοπάτια ρύθμισης των CKIs και οι διαφορετικές λειτουργίες που επάγουν.

Η PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) είναι σημαντική για τη σύνθεση του DNA και τη σύνδεση της πολυμεράσης δ με το DNA.

## 6. ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ - ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ CCNA – REPLACE STRATEGY (REplacement with Partial Ligand Alternatives through Computational Enrichment)

Η κυτταρική αύξηση και διαίρεση αποτελεί στόχο για την ανακάλυψη στοχευόμενων φαρμακευτικών ουσιών. Τα κύτταρα ανταποκρίνονται σε μια σειρά από πολυπληθή ερεθίσματα, αντιπροσωπεύοντας μια δυναμική βιολογική διαδικασία, όπου οι διάφορες πρωτεΐνες χαρακτηρίζονται από το ρόλο και τη λειτουργία τους μέσω αυτών των μηνυμάτων. Για να γίνουν κατανοητές όλες πτυχές των λειτουργιών, πρέπει να ληφθούν υπόψη οι πρωτεϊνικές ακολουθίες και η δομή για να αποκαλυφθούν τα μοτίβα που προβλέπουν τη λειτουργία τους αλλά και το προφίλ έκφρασής τους, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και οι αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες (Golemis E. , Protein-protein interactions : A molecular cloning manual, 2002). Το κομμάτι των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών περιλαμβάνει την πλειοψηφία των δράσεων των πρωτεϊνών ώστε να επιτελέσουν πιο ακριβείς και συγκεκριμένες λειτουργίες.

Οι περισσότεροι βιολογικοί παράγοντες που συμμετέχουν στη σηματοδότηση των μονοπατιών, εμφανίζονται μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (Protein-Protein Interactions, PPIs). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές πραγματοποιούνται με διάφορους τρόπους με τις πιο σημαντικές να είναι στην μεταβολή των κινητικών ιδιοτήτων, τη δημιουργία νέων συσχετισμών, την αδρανοποίηση ή καταβολή μιας πρωτεΐνης, να εξυπηρετούν ρυθμιστικούς ρόλους είτε επάγοντας είτε καταστέλλοντας μια λειτουργία και άλλα <sup>12</sup>. Σήμερα, οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις συνδέονται με την ανακάλυψη φαρμάκων <sup>13</sup>, καθώς έχουν αναδειχθεί ως στόχοι κατά όγκων όπως το σύμπλοκο



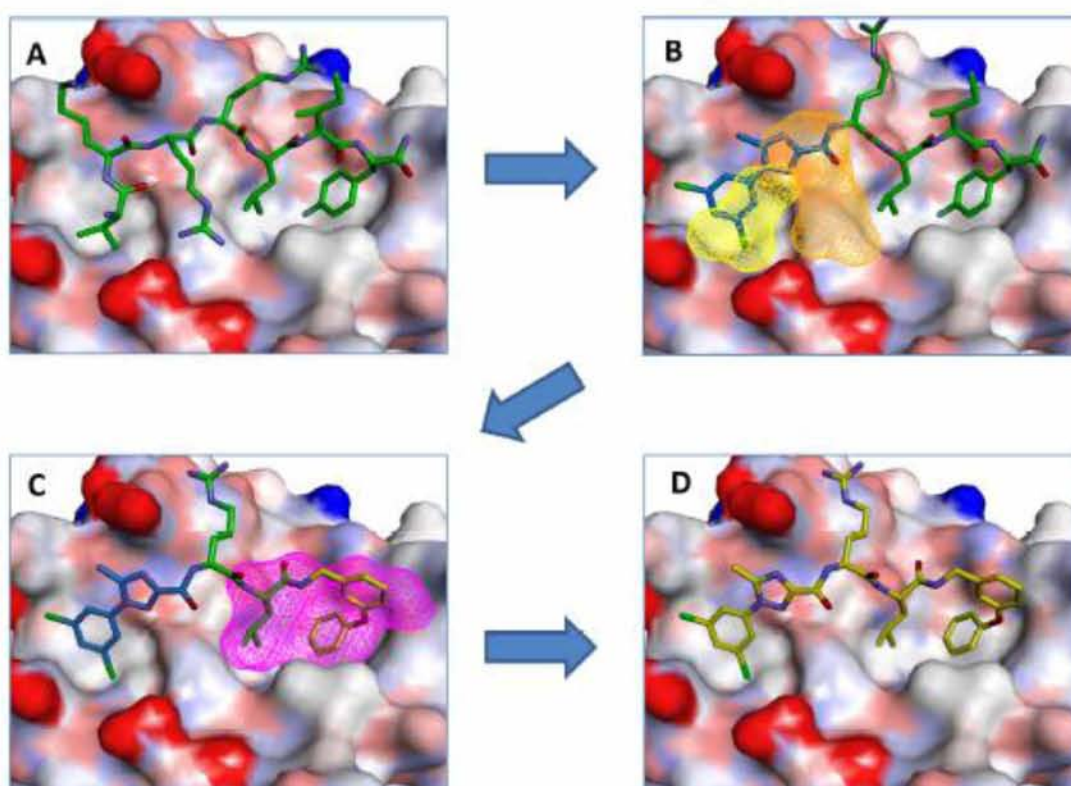
CDK/CCNA2. Κατάλληλοι παράγοντες, όπως οι CCNs και οι CDKs όπως έχει αναφερθεί ήδη, είναι ρυθμιστές της προώθησης του κύκλου, μέσω ενεργοποίησης των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Η σύνδεση της CCNA με της αντίστοιχες κινάσες υπόκειται σε μηχανισμούς που είναι σημαντικό να κατανοηθούν.

Αναστολείς για την ενεργοποίηση του συμπλόκου CDK/CCN αναφέρθηκαν οι περιπτώσεις όπου παρεμποδίζεται η δραστηριότητα της CDK είτε με τροποποίηση του χώρου της ATP (όπως συμβαίνει με το φάρμακο Seliciclib (CYC202)\* για τις CKD2, CDK7, CDK9 που βρίσκεται σε πειραματικό στάδιο κλινικών δοκιμών και δεν έχει ακόμη εγκριθεί για χρήση σε ασθενείς), είτε μπλοκάροντας την περιοχή σύνδεσης του υποστρώματος με την κυκλίνη. Η περιοχή αυτή της σύνδεσης με την κυκλίνη εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και υποσχόμενες στρατηγικές για την αναζήτηση επιλεκτικών ανταγωνιστικών ως προς την πρόσδεση ουσιών που θα οδηγούν σε απόπτωση. Αυτές οι θέσεις σύνδεσης της κυκλίνης (Cyclin Binding Groove, CBG), μπορούν να μπλοκαριστούν με μικρά συνθετικά πεπτίδια και που έμμεσα θα οδηγούν στην αναστολή της κινάσης<sup>14, 15</sup>.

Στη περίπτωση της CCNA2 (που παρομοιάζει με την CCND1), η αλληλουχία των αμινοξέων του μοτίβου της θέσης σύνδεσης της κυκλίνης (Cyclin Binding Motifs, CBM) το οκταπεπτίδιο HAKRRLIF και το πενταπεπτίδιο RRLIF έχουν ήδη μελετηθεί σε προηγούμενες ερευνητικές εργασίες<sup>14</sup>. Αυτό επιτρέπει την έρευνα σε τμήμα και όχι ολόκληρης της πρωτεΐνης, για τη δομική σχέση της δραστηριότητας της σύνδεσης (Structural Activity Relationship, SAR) με ένα μικρό μόριο αναστολέα στη περιοχή σύνδεσης της CCNA2. Από τις μελέτες φαίνεται πως το οκταπεπτίδιο HAKRRLIF εμφανίζει μεγαλύτερη ενεργότητα σύνδεσης (έως και 10 φορές μεγαλύτερη) από το πενταπεπτίδιο RRLIF από το οποίο έχει απομακρυνθεί το αμινοτελικό άκρο<sup>14, 16, 17</sup>. Κατά τη

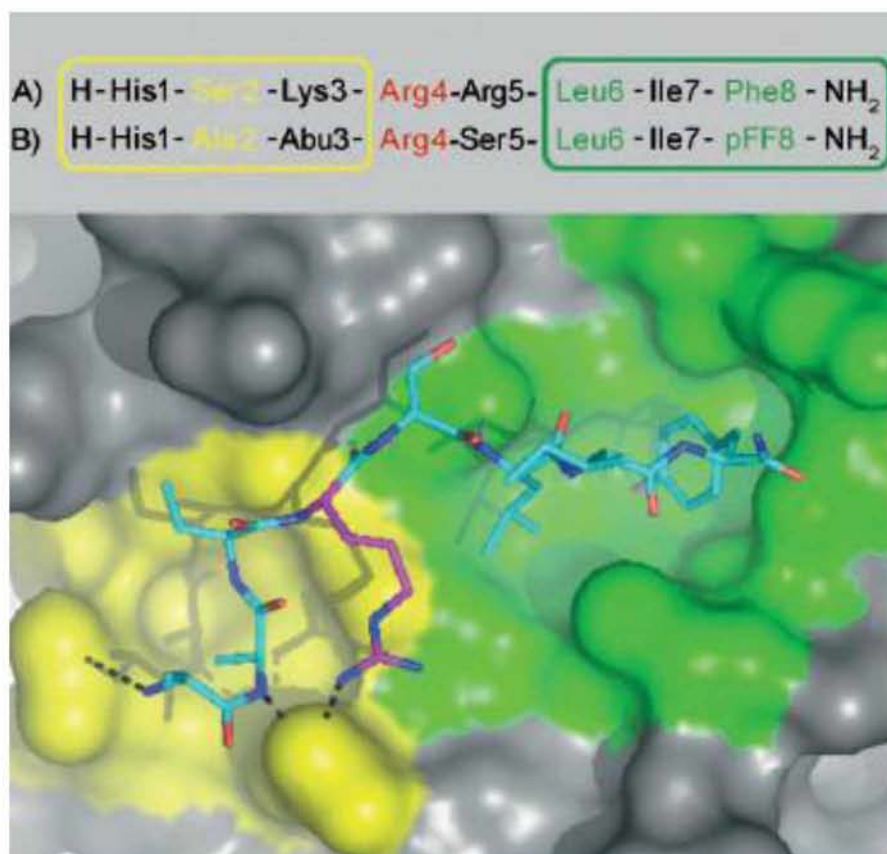
σύνδεση πραγματοποιούνται τροποποιήσεις και του αμινοτελικού και του καροξυτελικού άρκου.

Η επιστημονική κοινότητα αναζητά στρατηγικές για την ανάπτυξη αναστολέων για πληθώρα παθολογικών καταστάσεων, όπως είναι και ο καρκίνος, με όλο και μικρότερο κόστος αλλά και πιο αποτελεσματικούς<sup>3, 18</sup> ενώ για δημιουργία ανταγωνιστών στη περιοχή σύνδεσης και απενεργοποίησης της CCNA2, ακολουθήθηκε μια νέα στρατηγική που ονομάζεται **REPLACE** (**RE**placement with **P**artial **L**igand **A**lternatives through **C**omputational **E**nrichment)<sup>3</sup>. Η μέθοδος βασίζεται στον αρχικό σχεδιασμό *in silico* μικρών μιμητικών μορίων που μεταβάλλονται και μεταχειρίζονται έτσι ώστε μέσω, αρχικά, ενός λογισμικού προγράμματος να αυξάνουν την συγγένεια με τον στόχο τους. Οι στόχοι αυτοί αποτελούνται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών στη περιοχή CBMs.



Εικόνα 11. Η εμφάνιση των τροποποιήσεων μέσω του REPLACE στο ωκταπεπτιδικό CGI HAKRRLIF για τις N- and C- τελικές τροποποιήσεις.

Τα μη-πεπτιδικά αυτά μόρια δοκιμάζονται και στη συνέχεια σε πειραματικό επίπεδο κλίνονται να αντικαταστήσουν το ρόλο των φυσικών αναστολέων της CCNA και CCND που είναι αντίστοιχα οι CBG αναστολείς p21<sup>CIP1</sup> και p27<sup>KIP1</sup> 10, 19, 20.



Εικόνα 12. Η στρατηγική σχεδιασμού μέσω του REPLACE για τις θέσεις αναστολής της κυκλίνης (Cyclin-Groove Inhibitors, CGIs).

Στην εικόνα παρουσιάζεται η ακολουθία του φυσικού αναστολέα της CDK πρωτεΐνης p21<sup>WAF1</sup> (A), που αναγνωρίζει τις φορτισμένες θέσεις, στη θέση αναστολής. Η κάτω ακολουθία (B) εμφανίζει ένα βελτιστοποιημένο οκταπεπτίδιο με ενισχυμένη συγγένεια με την θέση, ενώ διατηρεί ένα μόνο θετικά φορτισμένο υπόλειμμα αργινίνης (Arg). Η βελτιωμένη αυτή αποτελεσματικότητα δημιουργεί μια υδροφοβική επαφή με την τρυπτοφάνη 217 (Trp217) της CCNA2, χωρίζοντας την

περιοχή σε δύο υπο-περιοχές, μία λιγότερη σημαντική της σύνδεσης (κίτρινη) και μια σημαντική για την σύνδεση περιοχή (πράσινη)<sup>3</sup>.

Αυτή η χημική συνθετική ανάλυση, δίνει τη δυνατότητα να εξουδετερωθεί το συνολικό φορτίο για βέλτιστη σύνδεση στη θέση σύνδεσης. Μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η δυνητική ανάπτυξη ισχυρών αναστολέων (ακόμη και πιο ισχυρών από τους φυσιολογικούς αναστολείς) μέσα από το σχεδιασμό αυτό, δημιουργώντας τμήματα-υποκαταστάτες (ligands) που θα έχουν εξειδικευμένο και στοχευμένο ρόλο στο σχεδιασμό φαρμάκων. Μέσω του REPLACE, έχουν ήδη δημιουργηθεί πιθανοί αναστολείς που η δυνητική τους ικανότητα αναστολής, μεταφέρεται στο πειραματικό στάδιο μέσα από δοκιμασίες με ITC (Isothermal titration calorimetry) γίνονται θερμοδυναμικοί χαρακτηρισμοί μεταξύ των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών. Δοκιμασίες έχουν γίνει ήδη και με σειρά συνθετικών πεπτιδικών αναλόγων, αναζητώντας την καλύτερη δομή συγγένειας με τον στόχο (Ενδεικτικές μορφές και αναλύσεις στο παράρτημα).

Αυτή η προσέγγιση ως αντικαρκινικός στόχος, παράγει αναστολείς για το CBG που μιμούνται τις αλληλεπιδράσεις τμήματος κυκλίνης και των υποκαταστατών και δίνει τη δυνατότητα τα συγγενή πεπτίδια που δοκιμάστηκαν, να αναπτυχθούν σε φαρμακευτικές ουσίες που θα χρησιμοποιηθούν σε θεραπευτικά σχήματα.

## 7. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ

Η κυτταρική αύξηση και διαίρεση θεωρείται ως ένας σημαντικός στόχος για την δημιουργία νέων φαρμακευτικών σκευασμάτων. Για την πειραματική εξέταση της στρατηγικής REPLACE, είναι απαραίτητο να γίνει ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός των φυσιολογικών τους μηχανισμών όπως και των βιοφυσικών τους ιδιοτήτων, όπου μέσα από την εξέτάσή τους, θα σχεδιαστούν πιθανοί ισχυροί αναστολείς της ενεργοποίησης του συμπλέγματος Cyclin-CDK. Ωστόσο, οι ποσότητες της ανθρώπινης πρωτεΐνης CCNA2 που απαιτούνται για μια τέτοια μελέτη είναι μεγάλες ( $> 1\text{mg}$ ) και επιπλέον πρέπει να έχουν υψηλή καθαρότητα ( $> 95\%$ ) ώστε σε επόμενο στάδιο να γίνει κρυστάλλωση μεμονωμένα του τμήματος της CCNA2 και όχι του ετεροδιμερούς συμπλόκου με την CDK της <sup>21-23</sup>. Η τάση της συνένωσης των δύο υπομονάδων κατά την εμφάνιση της στο ευκαρυωτικό κύτταρο, οδήγησαν την επιλογή του φορέα κλωνοποίησης και ξενιστή για παραγωγή της πρωτεΐνης, σε βακτηριακά στελέχη.

Κατά την εργασία αυτή αναπτύχθηκαν τεχνικές και πρωτόκολλα για την βελτιστοποίηση της υπερ-έκφρασης τμήματος της πρωτεΐνης CCNA2 με στόχο τα βέλτιστα επίπεδα καθαρότητας, ποσότητας και ενεργής λειτουργίας, προκειμένου να χαρακτηριστεί με πιθανούς αναστολείς που έχουν τη μορφή συντιθέμενων πεπτιδίων. Χρησιμοποιώντας τον προσδιορισμό της σταθεράς διάστασης (Kd) μέσω τιτλοδότησης με φασματοσκοπία φθορισμού κατά τη δέσμευσή της σε χαρακτηρισμένους υποκαταστάτες, έγινε μελέτη και της σχετικής ενεργότητας της αναδιπλωμένης CA2 σε συνάρτηση με την ανάκτηση της από τα σωματίδια εγκλεισμού (inclusion bodies).

## 8. ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΥ ΦΟΡΕΑ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ

Η επιλογή του σωστού συστήματος έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, σημαντική ώστε να επιτευχθεί ο στόχος της υπερ-έκφρασης. Ευκαρυωτικά συστήματα έκφρασης εμφανίζονται να χρησιμοποιούνται (διαμολυσμένα κύτταρα του *Baculovirus* SF9 ή SF21), ωστόσο τα βακτηριακά συστήματα προτιμούνται περισσότερο ως συστήματα έκφρασης και παραγωγής ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών όπως και των κυκλινών καθώς απουσιάζουν σε αυτά οι κινάσες συνεργάτες τους CDKs. Η *Escherichia coli* ως αρνητικά κατά Gram βακτήρια, πλεονεκτεί όσον αφορά την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Τα βακτηριακά συστήματα έκφρασης που χρησιμοποιούνται είναι πολλά και από τα πιο γνωστά είναι τα BL21(DE3), BL21(DE3)-pLysS, BL21 Star-pLysS, Origami, Rosetta, C43(DE3) και άλλα (παράρτημα). Η ποικιλία αυτή διαμορφώθηκε λόγω της μεγάλης ανάγκης για διαφορετικές, στο εσωτερικό, συνθήκες πλασμιδιακής έκφρασης όπως και λόγω της μεγάλης «δεξαμενής» στόχων για κλωνοποίηση.

Η μεγάλη παραγωγή ανασυνδυασμένων ανθρώπινων πρωτεϊνών είναι γνωστό ότι παρατηρείται στο σύστημα έκφρασης της *Escherichia coli*, οπότε και η επιλογή για την διερεύνηση της υπερ-έκφρασης αναζητήθηκε στα στελέχη BL21(DE3) και BL21(DE3)-pLysS. Πέρα από την επιλογή των στελεχών ελέγχεται και η ανθεκτικότητα σε κάποιο ή κάποια αντιβιοτικά.

Σε επόμενο στάδια γίνεται η επιλογή του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης. Τα πλασμίδια διαθέτουν χαρακτηριστικά, τα οποία τα τους δίνουν πλεονέκτημα ενάντια σε άλλους φορείς κλωνοποίησης. Η θέση έναρξης της αντιγραφής (*oriC*), τα γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό/ά για την επιλογή ανασυνδυασμένων κλώνων, θέσεις

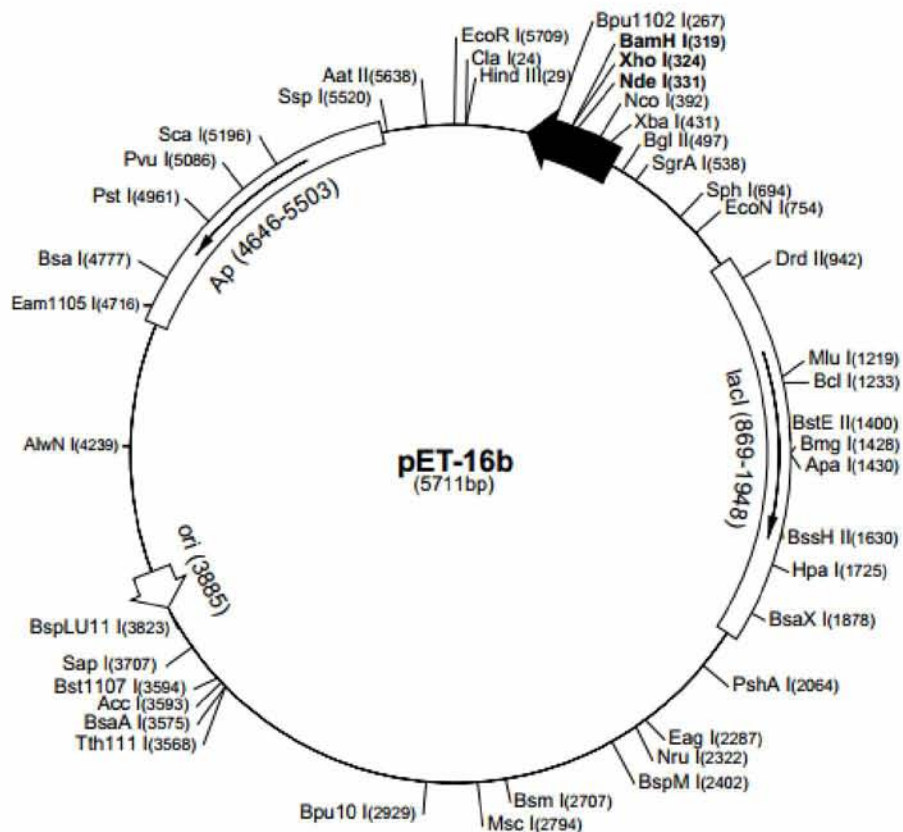


αναγνώρισης από περιοριστικές ενδονουκλεάσες καθώς και οι περιοχές του υποκινητή (P), του χειριστή (O) και καταστολέα (I) είναι χαρακτηριστικές για τα πλασμίδια. Τα πλασμίδια μπορούν να κατασκευαστούν ανάλογα και με τις ανάγκες του εκάστοτε ερευνητή.

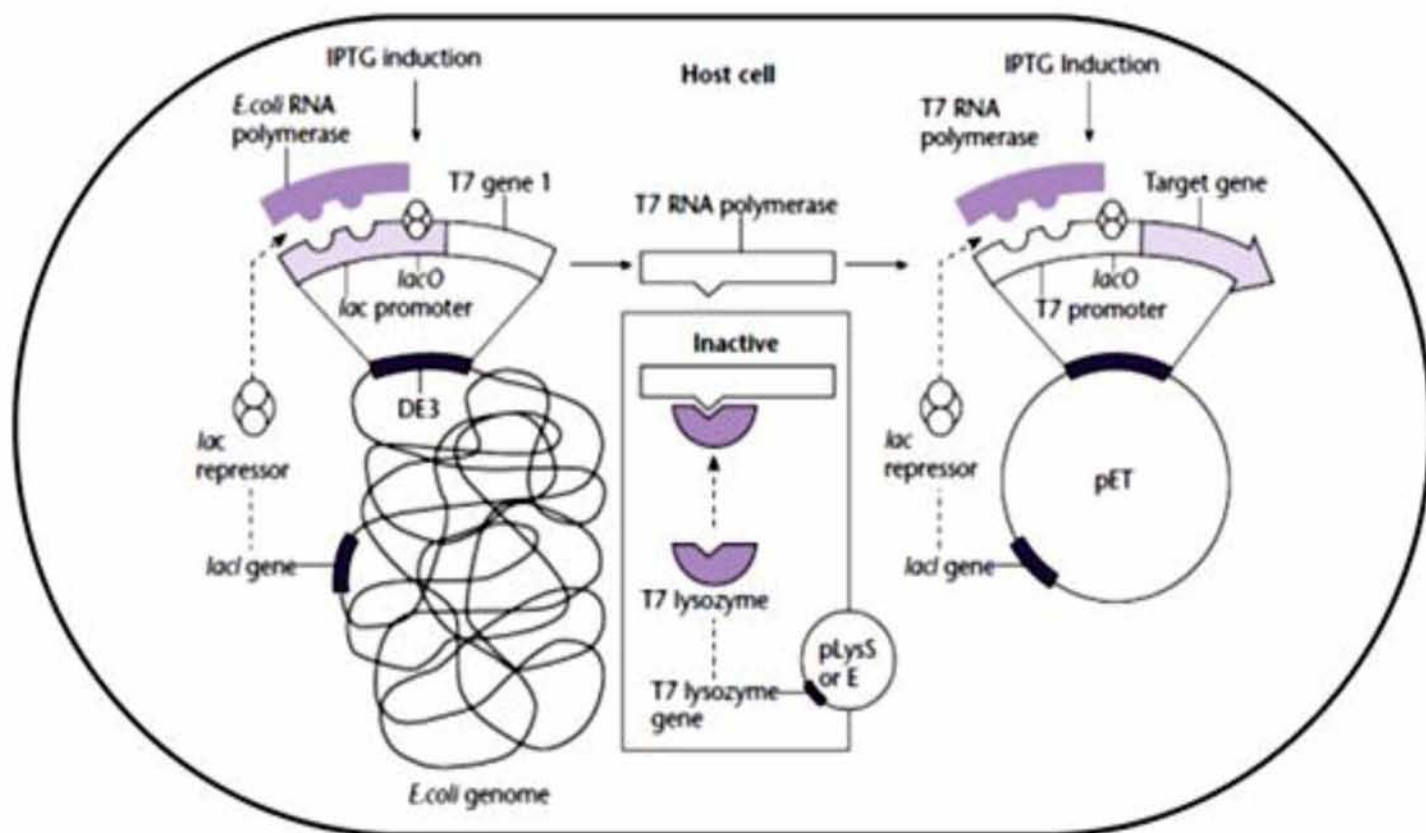
Για την επαγωγή για την υπερ-έκφραση της πρωτεΐνης στόχου CCNA2 επιλέξαμε το μηχανισμό μέσω του T7 υποκινητή που είναι αποκλειστικά ειδικός για την T7 RNA πολυμεράση (μη-βακτηριακή) και η οποία δεν εντοπίζεται στο βακτηριακό γονιδίωμα. Για να εκμεταλλευτούμε αυτές τις λειτουργίες έπρεπε να αναζητηθεί ο κατάλληλος βέκτορας. Δύο σημαντικοί μηχανισμοί εντοπίζονται στους βέκτορες pGEX και pET. Ο πρώτος επάγει την άμεση ρύθμιση μέσω του συστήματος lac, ενώ για τον δεύτερο η επαγωγή υπόκειται κάτω από το έλεγχο της T7 RNA Polymerase. Και οι δύο οι μηχανισμοί εκφράζουν ταχύτατα το προϊόν του γονιδίου όταν επάγουν την καλλιέργεια όπου η οπτικής της πυκνότητα στη φάση ανάπτυξης ( $OD_{600nm}$ ) φτάσει στο  $\approx 0.6$ . Για την εργασία επιλέχθηκε ο βέκτορας pET16b με επαγωγή της έκφρασης μέσω δομικά μιμητικού μορίου με την λακτόζη που συνδέεται στον lac αναστολέα, του IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside). Σε αντίθεση με τη λακτόζη, ο IPTG δε ανήκει σε κανένα από τα μονοπάτια του βακτηριακού κυττάρου, οπότε και δεν καταστρέφεται ή καταναλώνεται, παραμένοντας ενεργός και προωθώντας την έκφραση του στόχου.

pET-16b sequence landmarks

|  |           |
|--|-----------|
| T7 promoter  | 466-482   |
| T7 transcription start                                     | 465       |
| His•Tag coding sequence                                    | 360-389   |
| Multiple cloning sites<br>( <i>Nde</i> I - <i>Bam</i> H I) | 319-335   |
| T7 terminator  | 213-259   |
| <i>lac</i> I coding sequence                               | 869-1948  |
| pBR322 origin  | 3885      |
| <i>bla</i> coding sequence                                 | 4646-5503 |



Εικόνα 13. Ο pET-16b βέτορας με μια N-τελική His•Tag, Novagen,



Εικόνα 14. Το σύστημα επαγωγής με IPTG σε pET

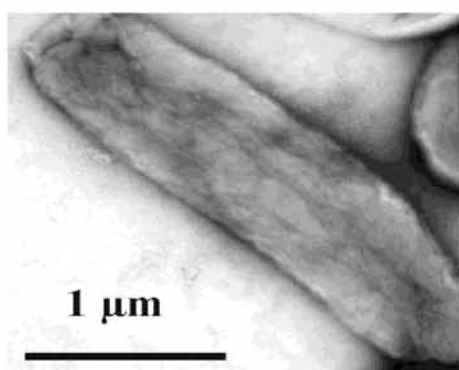


## 9. ΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ (Inclusion Bodies)

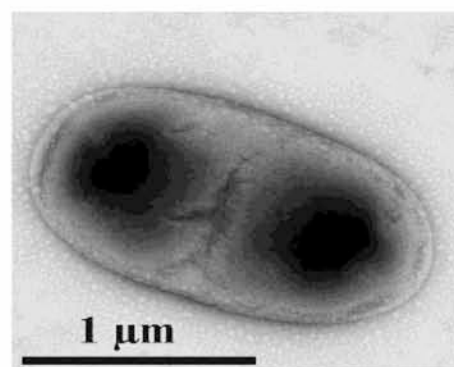
Στην αναζήτηση της υπερέκφρασης σε βακτηριακό κύτταρο, όπως η *Escherichia coli*, κατά την επαγωγή οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες συσσωρεύονται μέσα στο κύτταρο σχηματίζοντας αδιάλυτα σωματίδια, τα σωματίδια εγκλεισμού (inclusion bodies) <sup>24</sup>. Οι μηχανισμοί δεν είναι πλήρως γνωστοί ωστόσο φαίνεται πως ο σχηματισμός τους οφείλεται στην τάση του βακτηριακού κυττάρου να «συμμαζεύει» τα προϊόντα από την επαγωγή που δεν χρειάζεται και μοιάζουν να είναι ξένα σε αυτό. Η δημιουργία των σωματιδίων εγκλεισμού έχει ως αποτέλεσμα η μεγαλύτερη ποσότητα της πρωτεΐνης να μην βρίσκεται ελεύθερη στο κυτταρόπλασμα, αλλά να εντοπίζεται πακεταρισμένη μέσα σε αυτά τα σωματίδια. Και στη περίπτωση της CCNA2 παρατηρείται ο σχηματισμός τους. Παρακάτω θα παρουσιαστούν μέθοδοι για την ανάκτησή της.

### Electron Micrographs

Uninduced *E. coli* cell



*E. coli* cell induced to make recombinant protein. Dark regions are inclusion bodies.



Εικόνα 15. Απεικόνιση από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Αριστερά: το κύτταρο της *E. coli* χωρίς επαγωγή για την έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Δεξιά: το κύτταρο μετά την επαγωγή, οι μαύρες κηλίδες είναι και τα σωματίδια εγκλεισμού (inclusion bodies).

## 10. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΛΥΣΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ

Οι διαδικασίες που προτιμούνται για τη λύση είναι η ομογενοποίηση και η εφαρμογή υπερήχων μέσω βελόνας στο διάλυμά τους. Και οι δύο τεχνικές εστιάζουν στο σπάσιμο των μεμβρανών έτσι ώστε τα ανασυνδυασμένα προϊόντα να μετακινηθούν στο διάλυμα όπου ανακτώνται ανάλογα με το πρωτόκολλο που εφαρμόζεται. Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκαν και οι δύο τεχνικές για την εύρεση εκείνων των συνθηκών όπου θα παραχθεί και για να ανακτηθεί η βέλτιστη ποσότητα πρωτεΐνης.



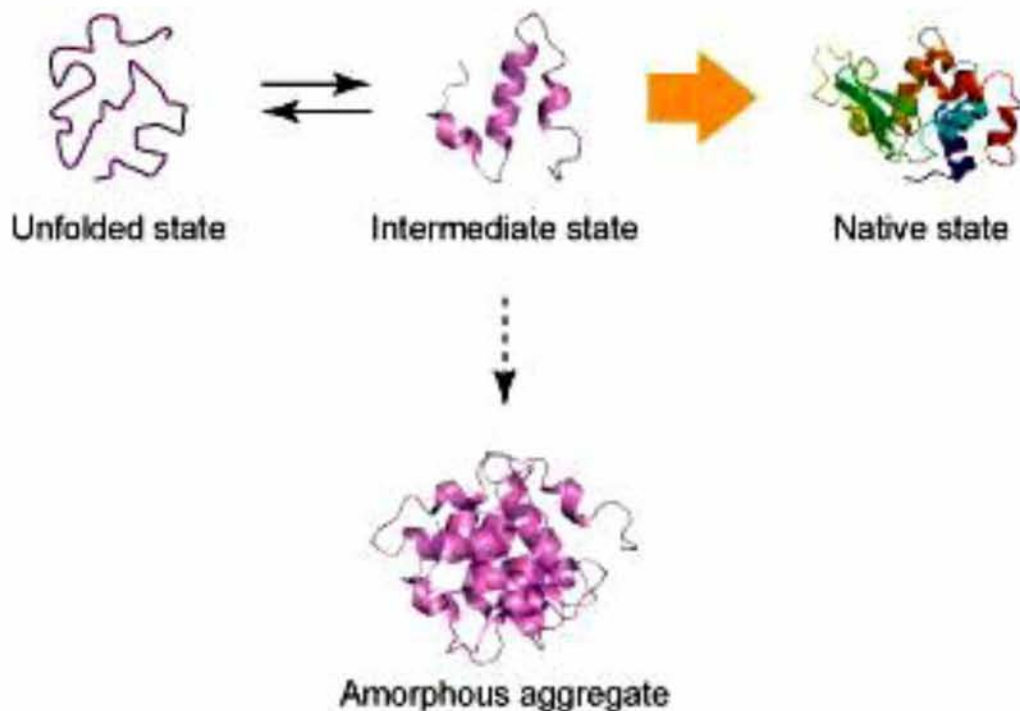
Εικόνα 16. Συσκευές εργαλεία, sonication (αριστερά), homogenizer (δεξιά).

## 11. ΑΝΑΔΙΠΛΩΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ (Refolding)

Το φυσιολογικό αποτέλεσμα της παραγωγής μιας πρωτεΐνης στο περιβάλλον της, έχει ως αποτέλεσμα την αναδίπλωσή της σε μια σταθερή 3D δομή, βιοχημικά ενεργή. Η αρχική αμινοτελική ακολουθία, υπόκειται σε τροποποιήσεις που μπορούν να συνοψιστούν σε πέντε ώστε να προκύψει το τελικό προϊόν με μια αρχική κατάλληλη αναδίπλωση, την ανάπτυξη των δισουλφιδικών δεσμών, προστίθενται με επιπλέον επεξεργασία υδατάνθρακες, πραγματοποιούνται ειδικές πρωτεολυτικές θραύσεις και τελικώς συγκροτούνται σε πολυμερείς πρωτεΐνες. Μέσα από αυτά τα στάδια, ακολουθείται ένας καθορισμένος τρόπος αναδίπλωσης όπου εμφανίζονται ειδικές δομές τις πρωτεΐνης, οι ενδιάμεσες δομές. Στις καταστάσεις αυτές, μια ομάδα πρωτεϊνών, οι πρωτεΐνες του θερμικού σοκ (Heat-shock proteins – HSPs ή και ως Molecular Chaperones) ή τις στρες πρωτεΐνες (Stress proteins) καθώς και ένζυμα αναδίπλωσης όπως είναι οι προπυλικές cis-trans-ισομεράσες (PPI) και η δισουλφιδική ισομεράση (PDI), παίζουν βοηθητικό ρόλο στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών χωρίς να διαδραματίζουν κάποιο δομικό ρόλο στη τελική αναδιπλωμένη μορφή της πρωτεΐνης. Αυτές οι συνοδές πρωτεΐνες απαντιούνται σε υψηλά επίπεδα στο σύνολο των οργανισμών, παρουσιάζοντας μεγάλες δομική ομοιότητα με συντηρημένες περιοχές από είδος σε είδος, ενώ εμφανίζουν σε κάποια από τα είδη μεγάλη τάση αύξησης σε ακραίες συνθήκες.

Η έκφραση πρωτεϊνών μέσα από την *Escherichia coli*, ως προκαρυωτικός οργανισμός, παρουσιάζει μειονεκτήματα ως προς την λειτουργικά κατάσταση κάποιων εκ των προϊόντων. Κάποιες από τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που παράγονται, δεν θα υποστούν τις απαραίτητες τελικές τροποποιήσεις. Το πρόβλημα εντείνεται καθώς κατά την επαγωγή οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες συσσωρεύονται μέσα στα

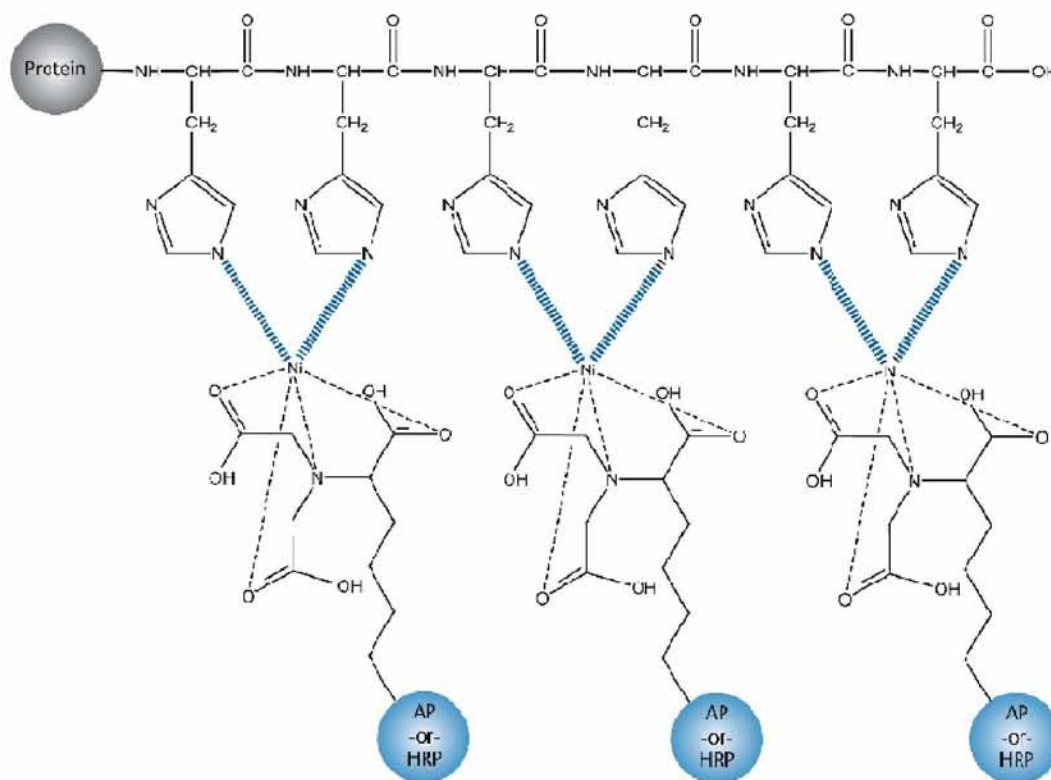
σωματίδια εγκλεισμού χάνοντας τη δομή τους. Η ανάκτησή τους είναι μια δύσκολη διαδικασία όπου πραγματοποιείται ουσιαστικά μετουσίωσή τους και με την εφαρμογή κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος, ώστε να προσομοιώνει το περιβάλλον όπου η πρωτεΐνη είναι ενεργή, και την ωθεί με τις κατάλληλες χημικές ουσίες που περιέχονται, να επαναδιπλωθεί. Στην εργασία επιχειρείται, μέσα από την ανάπτυξη πρωτοκόλλου, η αναζήτηση των κατάλληλων συνθηκών για την σωστή αναδίπλωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης CCNA2.



Εικόνα 17. Λειτουργική κατάσταση πρωτεΐνης.

## 12. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ - ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΜΕΤΑΛΛΟΥ (Affinity Chromatography) – ΙΟΝΤΟΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ (Ion Exchange Chromatography)

Έχουν αναπτυχθεί πολλοί τρόποι απομόνωσης της πρωτεΐνης στόχου μετά τα στάδια έκφρασης και αναδίπλωσης. Η επιλογή της τεχνικής αλλά και η επιτυχία του σταδίου αυτού εξαρτάται από τον αρχικό σχεδιασμό της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Με την χρωματογραφία συγγένειας, η πρωτεΐνη σημαίνεται με μια ουρά έξι-ιστιδινών (His) ή τρανσφεράσης γλουταθειόνης (GST), ή με σύνδεση με την πρωτεΐνη μαλτόζη (MBP). Τη σήμανση, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη τη μεταφέρει από το πλασμίδιο μέχρι την απομόνωση και τον καθαρισμό στη χρωματογραφία συγγένειας.



Εικόνα 18. Προσκόλληση πρωτεϊνών στην στήλη ιοντοανταλλαγής.

Η CCNA2 έχει σημειωθεί με την ουρά ιστιδίνης η οποία εμφανίζει συγγένεια με το νικέλιο. Η μέθοδος εκμεταλλεύεται αυτή την ισχυρή σχέση και καθώς το διάλυμα περνάει μέσα από τη στήλη, τα ακινητοποιημένα μόρια νικελίου, δεσμεύουν τις ιστιδίνες που είναι ενωμένες με τη πρωτεΐνη στόχο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να παραμένει η CCNA2 στη στήλη όπου με ειδικό διάλυμα «ξεπλένεται» και συλλέγεται από τη στήλη, λαμβάνοντας ένα καθαρό διάλυμα το οποίο περιέχει την πρωτεΐνη. Η ουρά ιστιδίνων μπορεί να αφαιρεθεί με κατάλληλες πρωτεάσες.

### **13. ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ (Fluorescence titration)**

Για να γίνει μελέτη της σταθεράς διάστασης, η καθαρισμένη, αναδιπλωμένη και διαλυτή ανασυνδυασμένη ανθρώπινη πρωτεΐνη CCNA2, προσεγγίστηκε ο χαρακτηρισμός με τιτλοδότηση φασματοσκοπίας φθορισμού και ισοθερμικές θερμιδομετρία τιτλοδότηση με ήδη καθιερωμένους συνεργάτες.

## **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **1. ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ CCNA2 ΚΑΙ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΥ ΒΕΚΤΟΡΑ**

Η ανθρώπινη cDNA Cyclin A2 αποκτήθηκε από την Geneservice (Source Bioscience UK Limited) και τα για την ενίσχυσή της μέσω PCR χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι εκκινητές:

*Cyclin A2-TEV-NdeI-Forward:*

GATGACTGACATATGGAGAACCTGTACTTTCAGGGTgtaccagactac  
catgagg

και

*Cyclin A2-BamHI-Reverse:*

GACTGAGGATCCTTACAGATTTAGTGTCTCTG.

Το κομμάτι TEV αποτελεί την αλληλουχία ENLYFQG όπου η αντίστοιχη πρωτεάση αναγνωρίζει την αλληλουχία και κόβει ανάμεσα από τις βάσεις Q και G ώστε να απομακρύνεται η ουρά ιστιδίνων και να πραγματοποιούνται οι μελέτες αναστολής. Το τμήμα της αλληλουχίας της ανασυνδυασμένης CCNA2 που μελετήθηκε και είναι από 174-432 (Glu 174- Leu 432), είναι βασισμένο στη βάση δεδομένων UniProtKB/Swiss-Prot, για την Ανθρώπινη Πρωτεΐνη CCNA2 των 432 αμινοξέων, Τελευταία τροποποίηση Νοέμβρης 2-2010, Version 2, P20248 σε μορφή FASTA:



>sp|P20248|CCNA2\_HUMAN Cyclin-A2 OS=Homo sapiens

GN=CCNA2 PE=1 SV=2

1

MLGNSAPGPATREAGSALLALQQTALQEDQENINPEKAAPVQQP  
RTRAALAVLKSGNPRGLAQQQRPKTRRVAPLKDLPVNDEHVTVP  
PWKANSKQPAFTIHVDEAEKEAQKKPAESQKIEREDALAFNSAIS  
LPGPRKPLVPLDYPMDGSFESPHTMDMSIILEDEKPVSVN

174 –

*EVDPDYHEDIHTYLREMEVKCKPKVGYMKKQPDITNSMRAILVDWLVE  
VGEEYKLQNETLHLAVNYIDRFLSSMSVLRGKLQLVGTAAMLLASKFE  
EIYPPEVAEFVYITDDTYTKKQVLRMEHLVLKVLTFDLAAPTVMNQFLT  
QYFLHQQPANCKVESLAMFLGELSLIDADPYLKYLPSVIAGAAFHLAL  
YTVTGWQSWPESLIRKTGYTLESCLKPCLMDLHQTYLKAPQHAQQSIREK  
YKNSKYHGVSLNPPETLNL*

-432

Το τμήμα αυτό απομονώθηκε χρησιμοποιώντας τα ένζυμα περιορισμού *Nde*I και *Bam*HI και κλωνοποιήθηκε στο βέκτορα pET16b+, έχοντας ως αποτέλεσμα το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο CyclinA2<sub>174-432</sub>-pET16b. Ακολούθησε μετασχηματισμός σε *E. coli*, όπου και η ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη CCNA2 με σήμανση έξι-ιστιδινών (His-Tag) στο ανιμοτελικό της άκρο περιέχοντας και μια θέση αναγνώριση για πέψη (TEV). Το πλασμίδιο αυτό εκφράστηκε για τις ανάγκες της διερεύνησης έκφρασης σε δύο διαφορετικά στελέχη, τα BL21(DE3) και BL21(DE3)pLysS.

Τα αντιβιοτικά για την ανθεκτικότητα των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν, εξασφαλίζουν την ικανότητα ανάπτυξης μόνο των μετασχηματισμένων βακτηρίων. Τα γονίδια, του πλασμιδίου, θα εκφράσουν το ή τα κατάλληλα αντιβιοτικά που θα παρεμποδίσουν τη σύνθεση κυτταρικού τοιχώματος, θα καταστρέψουν την κυτταρική



μεμβράνη και θα παρεμποδίσουν την πρωτεϊνοσύνθεση και τη σύνθεση των νουκλεϊνικών οξέων. Τα BL21(DE3) έχουν ένα γονίδιο ανθεκτικότητας που κωδικοποιεί για το αντιβιοτικό Αμπικιλίνη (Ampicillin) ενώ τα BL21(DE3)pLysS έχουν δύο γονίδια ανθεκτικότητας που κωδικοποιούν για την Αμπικιλίνη και την Χλωραμφενικόλη αντίστοιχα (Ampicillin and Chloramphenicol). Η συγκέντρωση των διαλυμάτων των αντιβιοτικών ήταν για την Ampicillin (sodium salt) 50 mg/ml διαλυμένη σε νερό, ενώ για την Chloramphenicol 34 mg/ml διαλυμένη σε αιθανόλη. Η αποθήκευσή τους γίνεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ , ενώ οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την πειραματική διαδικασία είναι με 100μg/ml (1/500 αραίωση) και με 170μg/ml (1/200 αραίωση) αντίστοιχα. Τα αντιβιοτικά εφαρμόζονται σε όλα τα στάδια ανάπτυξης της καλλιέργειας. Εξαίρεση αποτελούν τα αρχικά στάδια των βακτηριακών επιδεκτικών κυττάρων (competent cells) όπως και θα γίνει αναφορά παρακάτω.

Οι πιο συνήθεις συγκεντρώσεις κοινά χρησιμοποιούμενων αντιβιοτικών.

| Antibiotic               | Concentration of stock solution | Storage               | Working concentration (dilution) |
|--------------------------|---------------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| Ampicillin (sodium salt) | 50 mg/ml in water               | $-20^{\circ}\text{C}$ | 100 μg/ml (1/500)                |
| Chloramphenicol          | 34 mg/ml in ethanol             | $-20^{\circ}\text{C}$ | 170 μg/ml (1/200)                |
| Kanamycin                | 10 mg/ml in water               | $-20^{\circ}\text{C}$ | 50 μg/ml (1/200)                 |
| Streptomycin             | 10 mg/ml in water               | $-20^{\circ}\text{C}$ | 50 μg/ml (1/200)                 |
| Tetracycline HCl         | 5 mg/ml in ethanol              | $-20^{\circ}\text{C}$ | 50 μg/ml (1/100)                 |

Πίνακας 1. Τα πιο συνήθη αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται και οι συγκεντρώσεις τους

## 2. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

Για την ανάπτυξη των καλλιεργειών μικρής (πειραματικής) και μεγάλης κλίμακας (παραγωγής) καθώς και για τον μετασχηματισμό των επιδεκτικών κυττάρων, αλλά και για την επίστρωση τριβλίων, χρησιμοποιήθηκαν τα θρεπτικά LB, SOB και SOC όπως φαίνεται παρακάτω:

### LB medium:

Υπολογισμός

|                    |                |
|--------------------|----------------|
| <b>Tryptone</b>    | <b>1%</b>      |
| <b>Yeast</b>       | <b>0.5%</b>    |
| <b>NaCl</b>        | <b>1%</b>      |
| <b>NaOH (10 N)</b> | <b>0.1ml/L</b> |
| Με pH=7            |                |

Για τη δημιουργία LB τριβλίων (με και τα κατάλληλα αντιβιοτικά), προστίθεται Agar 1.5%.

### SOB medium:

Υπολογισμός

|                    |                |
|--------------------|----------------|
| <b>Tryptone</b>    | <b>2%</b>      |
| <b>Yeast</b>       | <b>0.5%</b>    |
| <b>NaCl</b>        | <b>0.05%</b>   |
| <b>KCl 250 mM</b>  | <b>1%</b>      |
| <b>NaOH (10 N)</b> | <b>0.1ml/L</b> |
| Με pH=7            |                |

Για τη δημιουργία SOC τριβλίων με τη προσθήκη MgSO<sub>4</sub> (20 mM) και Αντιβιοτικού/ά και Agar 1.5% από το SOB.

Επιλογή αντιβιοτικών, αραίωση 1:1000 (Amp, Kn, Chl..)

Για κάθε τριβλίο χρειάζονται 15-20ml των διαλυμάτων των θρεπτικών.

### 3. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ & ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (Competent Cells) *E. coli* ΜΕ ΤΗΝ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ $\text{CaCl}_2$

Η διαδικασία παρασκευής επιδεκτικών βακτηρίων για μετασχηματισμό με τη μέθοδο του χλωριούχου ασβεστίου για τα στελέχη BL21(DE3) και BL21(DE3)pLysS βασίστηκε στη παρατήρηση των Mandel και Higa <sup>25</sup> ότι τα κύτταρα είναι ικανά να προσλάβουν DNA όταν κατεργαστούν με ψυχρό διάλυμα  $\text{CaCl}_2$ . (Sambrook et al., *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed., 1989) Η δοκιμασία είναι μια ευαίσθητη διεργασία και συνίσταται προσεκτική προετοιμασία των υλικών καθώς και η προσοχή για τυχόν επιμολύνσεις. Η πορεία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

Παρασκευάζονται και αποθηκεύονται στους  $4^\circ\text{C}$ , φιλτραρισμένα και αποστειρωμένα κατά περίπτωση τα διαλύματα:

$\text{MgCl}_2 \rightarrow 2 \text{ M}$

$\text{CaCl}_2 \rightarrow 1 \text{ M}$

$\text{MgSO}_4 \rightarrow 1 \text{ M}$

Προετοιμασία με\_παγωμένα falcon tubes των 50ml και falcon tubes των 15ml (ανάλογα τα πλασμίδια), καθώς και προετοιμασία της ψυχώμενης φυγόκεντρου στους  $6^\circ\text{C}$ .

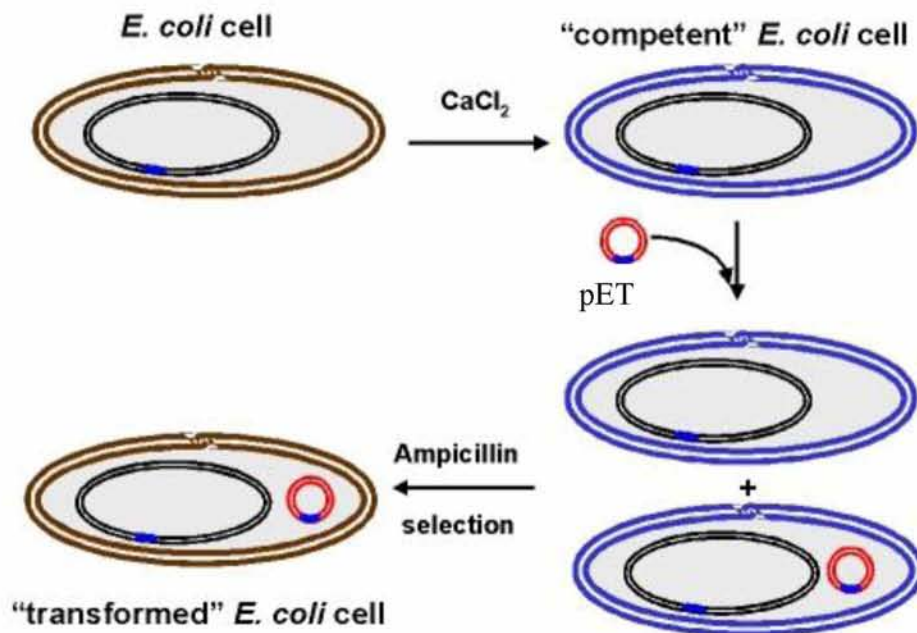
- Επίστρωση από stock «γυμνών» βακτηρίων (BL21, BL21pLysS) σε τριβλία (12-14h επώαση στους  $37^\circ\text{C}$ )
- Λήψη 2-3 αποικιών από κάθε πιάτο και ενοφθάλμισμα για 5ml καλλιέργεια **χωρίς αντιβιοτικά** για  $\approx 12\text{h}$  στους  $37^\circ\text{C}$
- Μεταφορά με 1:500 αραίωση σε μεγάλη καλλιέργεια (100μl σε 50ml), **χωρίς αντιβιοτικά**. (Υπολογισμοί για **50ml καλλιέργειας**)

- Επώαση για περίπου 3-3.5h ( $OD_{600}=0.3$ ) στους  $37^{\circ}\text{C}$
- Μεταφορά περιεχομένου φιαλών στα παγωμένα falcon και αμέσως στο πάγο για 10'.
- Φυγοκέντρωση για 10' στους  $6^{\circ}\text{C}$  στις 2700g
- Απόρριψη υπερκείμενου και επαναδιαλυτοποίηση με 30ml διαλύματος  $\text{MgCl}_2$  80 mM -  $\text{CaCl}_2$  20 mM
- Μεταφορά και πάλι για 20' στον πάγο
- Νέα Φυγοκέντρωση για 10' στους  $6^{\circ}\text{C}$  στις 2700g
- Απόρριψη υπερκείμενου και επαναδιαλυτοποίηση με 2ml  $\text{CaCl}_2$  0.1M
- Τοποθέτηση στο ψυγείο στους  $4^{\circ}\text{C}$  για 24-48h<sub>max</sub> (βέλτιστο στις  $\approx 24\text{h}$ ) με το διάλυμα του  $\text{CaCl}_2$ , ώστε να αποκτήσουν την επιδεκτική ικανότητα.

#### **Έναρξη του μετασχηματισμού των επιδεκτικών βακτηρίων:**

1. Μεταφορά 200μl από κάθε falcon tube των 50ml στα παγωμένα 15ml falcon tube και εισαγωγή 2μl πλασμιδίου.
2. Πάγος και ψυγείο για 45', παράλληλα δημιουργία διαλύματος 10ml SOC σε 15άρια ml falcon tube (Θρεπτικό SOB-Γλυκόζη- $\text{MgCl}_2$ )
3. Μεταφορά για 2' στους  $42^{\circ}\text{C}$
4. Νέα μεταφορά για 2' στον πάγο
5. Προσθήκη 800μl του SOC στα 15άρια ml falcon tubes
6. Επώαση για 1h στους  $37^{\circ}\text{C}$
7. Δημιουργία τριβλίων με SOB
8. Μετά την επώαση, μεταφορά σε eppendorf 1.5ml
9. Φυγοκέντρωση για 2' στις 10.000g
10. Απόρριψη υπερκείμενου, αλλά αφήνεται μια μικρή ποσότητα ( $\approx 50\mu\text{l}$ ) για επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος

11. Λήψη του επαναδιαλυτοποιημένου ιζήματος και στρώσιμό του στο τριβλίο
12. Μετά 12-16h επώαση του/των τριβλίων στους 37°C αναμένεται να έχουν εμφανιστεί οι ανασυνδυασμένες αποικίες.



Εικόνα 19. Η εισαγωγή του πλασμιδίου μέσω της διατάραξης της μεμβράνης του πλασμιδίου με  $\text{CaCl}_2$  (κάνοντάς το επιδεκτικό), ώστε να εισέλθει το πλασμίδιο.

## 4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

- **Φασματοφωτομετρική μέθοδος**

Ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών βασίζεται στην ιδιότητά τους να απορροφούν στην υπεριώδη περιοχή, με βέλτιστο τα 280nm. Η ιδιότητά τους οφείλεται στην παρουσία των αμινοξέων τυροσίνης, τρυπτοφάνης και λιγότερο της φαινυλαλανίνης, στο μόριο των πρωτεϊνών (Sambrook *et al.*, 1989).

Η μέθοδος είναι εύκολη και γρήγορη χωρίς να καταστρέφει τα δείγματα, μειονεκτεί όμως στην ακρίβεια και την εξειδίκευση αφού στην περιοχή αυτή απορροφούν και άλλες ενώσεις.

- **Μέθοδος προσδιορισμού πρωτεϊνών κατά Bradford τροποποιημένη από τον Bearden**

Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να συμπλέκεται με τις πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον. Ο σχηματισμός του συμπλόκου έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση του μέγιστου της απορρόφησης της χρωστικής από τα 465 nm στα 595 nm. Το αντιδραστήριο Bradford παρασκευάζεται με διάλυση της χρωστικής σε πυκνό φωσφορικό οξύ (85% v/v), σε συγκέντρωση 1 mg/ml. Το αντιδραστήριο αναδεύεται 12 ως 16 ώρες, στη συνέχεια αραιώνεται με H<sub>2</sub>O σε πενταπλάσιο όγκο και διηθείται και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου, προστατευόμενο από το φως <sup>26, 27</sup>. Χρησιμοποιείται σε αναλογία 1:1 με το δείγμα και μετράται η απορρόφηση στα 595 nm. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης γίνεται βάσει πρότυπης καμπύλης αναφοράς με γνωστές ποσότητες αλβουμίνης ορού βοδιού (BSA).

Πλεονεκτεί η μέθοδος ως προς την ακρίβεια και την ευαισθησία της, παρεμποδίζεται όμως από την παρουσία απορρυπαντικών και σουλφυδρυλομάδων.



- **Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου παρουσία SDS (SDS-PAGE)**

Κατά την ηλεκτροφόρηση με αποδιατακτικές συνθήκες, παρουσία SDS (μετά νατρίου άλας του θειικού δωδεκυλίου) οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση τη μοριακή τους μάζα <sup>28</sup>. Το SDS δεσμεύεται με υδρόφοβους δεσμούς στη ραχοκοκαλιά της πολυπεπτιδικής αλυσίδας σε αναλογία 1,4 g ανά g πρωτεΐνης, η οποία δεν εξαρτάται από τη φύση της πρωτεΐνης. Με τον τρόπο αυτό καταστρέφονται οι ανώτερες διαμορφώσεις των πρωτεϊνών και σχηματίζεται ένα σύμπλοκο SDS-πρωτεΐνης, αρνητικά φορτισμένο. Το φορτίο του συμπλόκου είναι ανάλογο του μεγέθους της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, όπως ανάλογη είναι και η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του. Για τον προσδιορισμό της μοριακής μάζας χρησιμοποιείται μίγμα πρωτεϊνών γνωστής μοριακής μάζας, το οποίο ηλεκτροφορείται μαζί με το δείγμα και από το διάγραμμα του λογαρίθμου της μοριακής μάζας συναρτήσει της κινητικότητας των πρωτεϊνών αυτών προσδιορίζεται η μοριακή μάζα του άγνωστου πεπτιδίου.

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε σύστημα ασυνεχές κατά Laemmli <sup>28</sup>. Για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού και της πηκτής επιστοίβαξης χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω συγκεντρώσεις:

- Πηκτή επιστοίβαξης: 6% w/v ακρυλαμίδιο, 0,2% w/v bis-ακρυλαμίδιο, 0,5% w/v SDS, 0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 0,08 w/v (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> και 0,2% v/v TEMED.
- Πηκτή διαχωρισμού: 8, 10 ή 12% w/v ακρυλαμίδιο, 0,33% w/v bis-ακρυλαμίδιο, 0,5% w/v SDS, 0,375 M Tris-HCl pH 8,9, 0,08% w/v (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> και 0,2% v/v TEMED.
- Διάλυμα επιστοίβαξης των δειγμάτων: 2% v/v SDS, 10% v/v γλυκερόλη, 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,02% w/v κυανού της βρωμοφαινόλης και 1% v/v β-μερκαπτοαιθανόλη.

Στα δείγματα που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν προστίθεται διάλυμα επιστοίβαξης σε τελική συγκέντρωση 1X (Sambrook *et al.*, 1989) και β-μερκαπτοαιθανόλη σε τελική συγκέντρωση 10% v/v και ακολουθεί θέρμανση στους 100 °C για 3-5 min με στόχο την πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Ως διάλυμα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται το ρυθμιστικό διάλυμα 25 mM Tris-HCl, 0,192 M γλυκίνη και 0,1% w/v SDS, pH 8,3. Η τάση του ρεύματος αρχικά προσαρμόζεται στα 60V, μέχρι τα δείγματα να εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού, ενώ στη συνέχεια αυξάνεται στα 120 V.

- **Χρώση πρωτεϊνών σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου - Χρώση με χρωστική Coomassie Brilliant Blue (CBB)**

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην αντίδραση των πρωτεϊνών με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250, όπως και στη μέθοδο Bradford (Hames and Rickwood, *Gel electrophoresis. A practical approach*, 1985). Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα 0,1% w/v χρωστικής σε 45% v/v μεθανόλη και 10% v/v οξικό οξύ. Το διάλυμα αυτό εκτός από διάλυμα χρώσης, είναι και διάλυμα στερέωσης. Η χρώση γίνεται με εμβάπτιση της πηκτής στο παραπάνω διάλυμα για διάστημα από 2 έως 16 ώρες και ακολουθεί αποχρωματισμός με διάλυμα 10% v/v μεθανόλης και 10% v/v οξικού οξέος.

- **Ανοσοαποτύπωση (Western Blot)**

Με την ανοσοαποτύπωση ανιχνεύεται μια πρωτεΐνη, η οποία έχει δεσμευθεί σε μεμβράνη με τη βοήθεια αντισώματος που έχει αναπτυχθεί έναντι αυτής. Αντιγόνο και αντίσωμα σχηματίζουν σύμπλοκο και στη συνέχεια επωάζεται η μεμβράνη με το δευτερεύον αντίσωμα στο οποίο είναι δεσμευμένο ομοιοπολικά ένα ένζυμο δείκτης. Το δευτερεύον αντίσωμα αναγνωρίζει το πρωτεύον και σχηματίζει σύμπλοκο με αυτό, ενώ το ένζυμο που φέρει καταλύει μια χρωμογόνο αντίδραση, το προϊόν της οποίας είναι δυσδιάλυτο και χρωματίζει τη μεμβράνη στην περιοχή που είναι το αντιγόνο <sup>29</sup>.

Ως δευτερεύον αντίσωμα χρησιμοποιήθηκαν οι ανοσοσφαιρίνες IgC κατσίκας, που έχει ανοσοποιηθεί με ανοσοσφαιρίνες IgC κουνελιού (anti-rabbit IgC), ενώ το ένζυμο δείκτης που είναι ομοιοπολικά δεσμευμένο με το δευτερεύον αντίσωμα, είναι η αλκαλική φωσφατάση.

Αρχικά η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε 5% w/v διάλυμα σκόνης γάλακτος (άπαχο γάλα εμπορίου) σε PBS (8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,15 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> και 0,2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), για να κορεσθεί με τις πρωτεΐνες του, κυρίως την καζεΐνη, ώστε να αποφευχθεί η μη εξειδικευμένη δέσμευση του αντισώματος στη μεμβράνη. Η επώαση με τον αντιγόρο που έχει αναπτυχθεί έναντι της φλαγγελίνης, στη συγκεκριμένη περίπτωση, διαρκεί δύο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου όπως και η επώαση με το δευτερεύον αντίσωμα. Μετά από κάθε επώαση η μεμβράνη ξεπλένεται με διάλυμα PBS στο οποίο έχει προστεθεί 0,05% w/v Tween-20, για την απομάκρυνση των αντισωμάτων που δεν δεσμεύτηκαν. Η εμφάνιση γίνεται με επώαση της μεμβράνης σε ρυθμιστικό διάλυμα 100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl και 5 mM MgCl<sub>2</sub> στο οποίο έχει προστεθεί το υπόστρωμα το μονοκλωνικό αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση (horseradish peroxidase).

## 5. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΙΣΟΔΟΥ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ ΜΕ ΤΗ CCNA2

Ο καθαρισμός και η απομόνωση του πλασμιδίου pET16b-Cyclin A2 από την *E. coli*, πραγματοποιήθηκε με τα αντιδραστήρια της εταιρείας NucleoSpin® Plasmid, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Η συντήρηση των απομονωμένων πλασμιδίων έγινε με αποθήκευση στους -20°C σε ΑΕ ρυθμιστικό διάλυμα. Η ανίχνευση και ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *NdeI* και *BamHI* που πέπτουν σε συγκεκριμένα σημεία σύμφωνα με το πλασμιδιακό χάρτη. Η ανάλυση των προϊόντων DNA έγινε σε 1% αгарόζη (TBEX1).

## 6. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΙΑΛΥΤΟΤΑΣ ΤΗΣ CCNA2

Αναζητώντας ένα αρχικό προφίλ έκφρασης της CCNA2, έγινε λήψη αποικίας από τα τριβλία με τα μετασχηματισμένα βακτήρια και ανάπτυξη τους για 12 ώρες στους 37°C σε καλλιέργεια 5ml θρεπτικού LB με τα κατάλληλα αντιβιοτικά για τα δύο στελέχη BL21(DE3) και BL21(DE3)pLysS αντίστοιχα. Μετά την ανάπτυξη τους, έγινε αραίωσή τους 1:500 και εκ νέου ανάπτυξη για 3-3.5 ώρες στους 37°C με συνεχή ανάδευση. Για να ελεγχθεί η έκφραση και η διαλυτότητα των αποικιών για το κάθε στέλεχος, τα δείγματα χωρίστηκαν σε αυτά που έγινε επαγωγή με IPTG 0.1mM και σε αυτά που δεν έγινε επαγωγή στην έκφραση. Σε όλα τα δείγματα, τα κύτταρα συλλέχτηκαν και καθαρίστηκαν PBS μέσω φυγοκέντρωσης. Τα κύτταρα διαλυτοποιήθηκαν σε διάλυμα για λύση τους που περιείχε PBS, Triton-X 0.1%, 1 mg/ml lysozyme και PMSF 1 mM. Τα δείγματα αφέθηκαν για μία ώρα στους 4°C για τη δράση της λυσοζύμης, προτού εφαρμοστεί σε αυτά μέσω ακίδας, υπέρηχοι για το σπάσιμο των μεμβρανών <sup>21-23</sup>. Για το διαχωρισμό του

διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος έγινε φυγοκέντρωση και το ίζημα επαδιαλυτοποιήθηκε σε PBS. Η ανάλυση όλων των κλασμάτων έγινε με ηλεκτροφόρηση σε 12% (w/v) SDS-PAGE.

## 7. ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ CCNA2

Όπως αναφέρθηκε, οι φορείς για τον έλεγχο της έκφρασης, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με τους ξενιστές BL21 (DE3) και BL21 (DE3)pLysS. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα με την pET16b-Cyclin A2, αναπτύχθηκαν κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 37°C σε θρεπτικό LB και με αραιώση 1:500, επώαστηκαν στους 37°C σε φρέσκο LB για 3-4 ώρες ώστε να φτάσουν σε οπτική πυκνότητα στο  $OD_{600nm}=0.6$ . Και στα δύο στάδια η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε παρουσία των κατάλληλων αντιβιοτικών<sup>21-24</sup>.

Η επαγωγή έγινε με την χορήγηση IPTG, αμέσως μόλις η οπτική πυκνότητα της αποικίας έφτασε το 0.6. Οι προσεγγίσεις που αναπτύχθηκαν για την αναζήτηση της υπερ-έκφρασης αναλύονται σε επόμενο κομμάτι<sup>30-32</sup>.

Για την ανάπτυξη της πειραματικής προσέγγισης για την διερεύνηση των συνθηκών της υπερέκφρασης, πραγματοποιήθηκαν μικρών καλλιιεργειών, ενώ για την παραγωγή την ανασυνδυασμένης CCNA2 στις βέλτιστες συνθήκες πραγματοποιήθηκαν μεγάλες καλλιιεργειες (Balbâas and Lorence, *Recombinant gene expression: reviews and protocols. 2nd ed. Methods in molecular biology*, 2004).

## **8. ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΣΩΜΑΤΙΔΙΑΚΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΤΩΝ. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ**

Κατά τη διαδικασία αυτή μπορεί να επηρεαστεί η ενεργότητα της πρωτεΐνης που παράχθηκε. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν είναι η μηχανική μέσω ομογενοποίησης και η τεχνική μέσω υπερήχων. Σκοπός ήταν η ανάκτηση περισσότερης ποσότητας από τα σωματιδιακά έγκλειστα, καθώς εκεί φαίνεται πως η CCNA2 να συσσωρεύεται.

## **9. ΑΝΑΔΙΠΛΩΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ (Refolding)**

Η διαδικασία ανάκτησης της πρωτεΐνης από τα σωματιδιακά έγκλειστα, έχει αποδιατάξει την πρωτεΐνης στόχο, την CCNA2. Εξετάστηκαν μια σειρά από συνθήκες μέσω του "QuickFold™ Protein Refolding KIT" που χρησιμοποιήθηκε για τη πραγματοποίηση του ελέγχου της αναδίπλωσης καθώς και η μέθοδος της διαπίδυσης.

## **10. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ ΜΕΣΩ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ**

Η διαδικασία καθαρισμού και απομόνωσης της ανασυνδυασμένης CCNA2 (**Purification of the cyclin A2/6xHis Recombinant Protein**), έγινε αρχικά με την Protino® Ni-TED Packed Columns – purification under native conditions. Για τον καθαρισμό μεγάλης κλίμακας, η πρωτεΐνη περνάει μέσα από στήλη Ni-NTA χρωματογραφίας συγγένειας, χρησιμοποιώντας την IMAC-Ni<sup>2+</sup> στήλη σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.



## **11. ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ-ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΕΣΩ ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ**

Διαδικασία με την οποία προσδιορίστηκαν η σταθερά διάστασης ( $K_d$ ) μέσω τιτλοδότησης με φασματοσκοπία φθορισμού κατά τη δέσμευσή της με ήδη γνωστούς υποκαταστάτες και μελετήθηκε η σχετική ενεργότητα της αναδιπλωμένης CA2 σε συνάρτηση με την ανάκτηση της με το Hitachi Fluorometer F-2500.

## ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

### 1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ CCNA2

Για την ανάλυση της έκφρασης της CCNA2 στα BL21 (DE3) και BL21 (DE3) pLysS, διεξήχθη πειραματικός σχεδιασμός για την εξέταση των συνθηκών της υπερ-έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στο *E. coli*. Όλα τα μετασχηματισμένα βακτήρια με την pET16b-Cyclin A2, πραγματοποίησαν αύξηση της καλλιέργειας μέχρι η οπτική πυκνότητά της να φτάσει την τιμή  $OD_{600nm} = 0.6$ . Η διερεύνηση περιέλαβε μεταβλητές για την επαγωγή της CCNA2 έγινε με IPTG με συγκεντρώσεις 0.1mM και 1 mM, θερμοκρασίες επαγωγής για τους 20°C και τους 30°C και τη χρονική διάρκεια της επαγωγής για 4h και 24h [9]. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στους 3500g για 20', ενώ ξεπλύθηκαν με το ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Στο στάδιο αυτό, τα κύτταρα μπορούν να αποθηκευτούν στους -20°C. Προκειμένου να εξεταστούν τα προφίλ της διαλυτότητας και για την εκτίμηση της υπερ-έκφραση της CCNA2, έγινε ανάλυση με 12% (w/v) SDS-PAGE.

Πραγματικό:

|                    |                 |       |
|--------------------|-----------------|-------|
| Host               | BL21            | pLysS |
| Temperature        | 20°C            | 30°C  |
| IPTG (mM)          | 1mM             | 0.1mM |
| Induction time (h) | 24h (Overnight) | 4h    |

Κωδικοποιημένο:

|                    |   |    |
|--------------------|---|----|
| Host               | 1 | -1 |
| Temperature        | 1 | -1 |
| IPTG (mM)          | 1 | -1 |
| Induction time (h) | 1 | -1 |

Πίνακας 2. Οι πραγματικές και οι κωδικοποιημένες παράμετροι της διερευνητικής διαδικασίας

| RUN | HOST | TEMP | IPTG | INDUCTION t |
|-----|------|------|------|-------------|
| 1   | 1    | 1    | -1   | -1          |
| 2   | 1    | 1    | 1    | -1          |
| 3   | 1    | 1    | -1   | 1           |
| 4   | 1    | 1    | 1    | 1           |
| 5   | 1    | -1   | -1   | -1          |
| 6   | 1    | -1   | 1    | -1          |
| 7   | 1    | -1   | -1   | 1           |
| 8   | 1    | -1   | 1    | 1           |
| 9   | -1   | 1    | -1   | -1          |
| 10  | -1   | 1    | 1    | -1          |
| 11  | -1   | 1    | -1   | 1           |
| 12  | -1   | 1    | 1    | 1           |
| 13  | -1   | -1   | -1   | -1          |
| 14  | -1   | -1   | 1    | -1          |
| 15  | -1   | -1   | -1   | 1           |
| 16  | -1   | -1   | 1    | 1           |

Πίνακας 3. Επάνω: ο κεντρικός σχεδιασμός με όλους του προς μελέτη συνδυασμούς. Κάτω: Η αντιστοιχία της κωδικοποίησης στις πραγματικές συνθήκες για το κάθε δείγμα.

**BL21 (DE3)**

| RUN  | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| IPTG | 1M   | 0.1M | 1M   | 0.1M | 1M   | 0.1M | 1M   | 0.1M |
| TIME | 24h  | 24h  | 4h   | 4h   | 24h  | 24h  | 4h   | 4h   |
| TEMP | 20°C | 20°C | 20°C | 20°C | 30°C | 30°C | 30°C | 30°C |

**BL21 (DE3) pLysS**

| RUN  | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   | 16   |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| IPTG | 1M   | 0.1M | 1M   | 0.1M | 1M   | 0.1M | 1M   | 0.1M |
| TIME | 24h  | 24h  | 4h   | 4h   | 24h  | 24h  | 4h   | 4h   |
| TEMP | 20°C | 20°C | 20°C | 20°C | 30°C | 30°C | 30°C | 30°C |

## 2. ΛΥΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ - ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗΣ ΤΩΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΑΚΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΤΗΣ CCNA2

Κατά την υπερ-έκφραση της CCNA2, όπως ήδη έχει αναφερθεί, η πρωτεΐνη εγκλωβίζεται μέσα σε σωματίδια εγκλεισμού. Για την ανάκτησή της από τα σωματίδια αυτά μιας διαλυτής μορφής της πρωτεΐνης, ήταν αναγκαία η ανάπτυξη πρωτοκόλλου μέσα από τον πειραματισμό για τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών<sup>33, 34</sup>.

Για τον καθαρισμό των σωματιδίων που εμπεριέχουν την CCNA2, τα κύτταρα (του προηγούμενου σταδίου της έκφρασης) επαναδιαλυτοποιήθηκαν με lysis buffer (που περιέχει PBS και Triton-X 0.1%) και η διαρραγή των κυττάρων επιτεύχθηκε προσθέτοντας 1 mg/ml lysozyme και PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) σε τελική συγκέντρωση του 1 mM. Το διάλυμα παραμένει στους 4°C για 1 h.

Σε πρώτο στάδιο, η διαδικασία λύσης κυττάρων και ανάκτησης της πρωτεΐνης από τα inclusion bodies, περιελάμβανε τις μεθόδους ομογενοποίησης (Homogenization) και την εφαρμογής υπερήχων στο διάλυμα (Sonication). Με τη πρώτη μέθοδο, τα κύτταρα επεξεργάζονται με μια σειρά από τρεις διαδοχικές ομογενοποιήσεις και φυγοκεντρήσεις. Η ομογενοποίηση συμβαίνει με ειδικό μηχάνημα και πραγματοποιείται παρουσία πάγου για περίπου 10-15' και η φυγοκέντρωση γίνεται στους 4°C σε στροφές που ποικίλουν ανάλογα με το χρονική διάρκεια της φυγοκέντρωσης. Το sonication των κυττάρων πραγματοποιείται με δέκα επαναλαμβανόμενους γύρους των 20s όπου εφαρμόζονται οι υπέρηχοι και 30s όπου αφήνεται το διάλυμα να ηρεμήσει ανάμεσα στους κύκλους. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 12,000g για 30 min στους 4°C με σκοπό το διαχωρισμό διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος. Είναι σημαντικό ότι και στη μέθοδο sonication να πραγματοποιείται σε πάγο.

Σε δεύτερο στάδιο, στο αδιάλυτο κλάσμα περιέχονται τα σωματίδια εγκλεισμού όπου γίνεται επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος και η διαδικασία επαναλαμβάνεται με μικρότερους κύκλους.. Αναλυτικά για τον καθαρισμό των και την αποδιάταξη:

**Homogenization method:** Μετά από φυγοκέντρηση στις 12,000g για 30 min στους 4°C με το lysis buffer, το ίζημα (αδιάλυτο κλάσμα που περιέχει τα inclusion bodies) επαναδιαλυτοποιούνται με ένα ρυθμιστικό διάλυμα για την πλύση τους που περιέχει EDTA 2mM, Tris 50mM και NaCl 0,3M. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται τρεις φορές. Η πρώτη και δεύτερη πραγματοποιήθηκε με επιπλέον την προσθήκη 0.1% Triton-X 10%. Το κάθε στάδιο πραγματοποιήθηκε με 10'-15' ομογενοποίηση και με φυγοκέντρηση στις 9200g για 45-50'. Το ίζημα αποθηκεύεται στους -20°C.

**Sonication method:** Μετά από φυγοκέντρηση στις 12,000g για 30 min στους 4°C με το lysis buffer, το ίζημα (αδιάλυτο κλάσμα που περιέχει τα inclusion bodies) επαναδιαλυτοποιούνται με ένα ρυθμιστικό διάλυμα για την πλύση τους PBS, 1% Triton X-100 και εφαρμόζονται τρεις κύκλοι sonication με 10s sonication και 20s ηρεμίας στο πάγο ανάμεσα στους κύκλους αναδεύοντας συχνά και καλά. Έγινε φυγοκέντρηση στις 15000g για 30' και επαναδιαλυτοποίηση με PBS και NaCl 1M για την απομάκρυνση των DNA και RNA υπολειμμάτων, ώστε να ακολουθήσει φυγοκέντρηση στις 15000g για 30' και να ληφθούν στο ίζημα τα καθαρισμένα σωματίδια εγκλεισμού..

Η επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε RT συνθήκες και η αποδιάταξη των inclusion bodies γίνεται με διάλυμα ουρίας που περιέχει 8M Urea, 50 mM Tris-Cl, 10 mM DTT σε pH 8.0. Για την αποδιάταξη και προετοιμασία της CCNA2 για την αναδίπλωσή της, διεξήχθησαν πειραματικές προσεγγίσεις τόσο σε διάλυμα Ουρίας (όπως αναφέρθηκε) στους 4°C κατά τη διάρκεια της νύχτας κάτω από συνθήκες συνεχής

ανάδευσης, όσο και σε διάλυμα Υδροχλωρικής Γουανιδίνης (Guanidine hydrochloride) που περιείχε 0.1M Tris, 80 mM GSH και 2 mM EDTA σε pH 8.5 κάτω από συνεχή απαλή ανάδευση για 3 ώρες.

Η εκτίμηση της ποσότητας ανάκτησης της CCNA2 έγινε μέσω της μεθόδου Bradford, όπως αυτή περιγράφηκε παραπάνω, ώστε να γίνει προσαρμοστεί η συγκέντρωση για την δοκιμασία αναδίπλωσης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Η ανίχνευση και αξιολόγηση της CCNA2 για όλα τα παραπάνω στάδια έγινε με ανάλυση

### **3. ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΑΝΑΔΙΠΛΩΣΗΣ (Refolding Strategies)**

Οι συνθήκες αναδίπλωσης της διαλυτής CCNA2 επίσης μελετήθηκαν. Για το σκοπό αυτό δοκιμάστηκαν διάφορες συνθήκες που περιείχαν συγκεντρώσεις GSH/GSSG και DTT αντίστοιχα στο ρυθμιστικό διάλυμα που έγινε εισαγωγή της πρωτεΐνης για να ξεκινήσει η διαδικασία της αναδίπλωσής της<sup>35, 36</sup>.

Αναλυτικά, εφαρμόστηκε η διαδικασία της διαπίδυσης (Dialysis Method), όπου μετά την αρχική ομογενοποίηση των κυττάρων έγινε επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος για 4η φορά, με 100 ml του διαλύματος που δεν περιείχε Triton και ακολούθησε φυγοκέντρωση 9800g για 1h ώρα στους 4°C. Τα στάδια προετοιμασίας του διαλύματος για τη διαπίδυση περιλαμβάνουν την φάση του εγκλεισμού που γίνεται σε επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 15ml, pH=8.5 περιέχοντας 6M Guanidine Hydrochloride, 0.1 M Tris, 80 mM reduced GSH και 2mM EDTA. Ακολουθεί για 2h ανάδευση σε RT συνθήκες και φυγοκέντρωση στους 25°C για 25' στις 18500g. Λαμβάνεται το υπερκείμενο, το οποίο αποτελεί και τη πρωτεΐνη CCNA2 και για 72ώρες με ελαφριά ανάδευση στους 4°C σε ρυθμιστικό διάλυμα αναδίπλωσης με 0.1 M Tris, 0.5 M L-



Arginine και 0.33 M GSSG σε pH=8,5 καθώς και ρυθμίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης με τον όγκο του ρυθμιστικού διαλύματος, σε 0,1mg/ml. Στη συνέχεια, γίνεται αλλαγή του Buffer σε 50 mM Tris, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% Monothioglycerol και 0.01% NaN<sub>3</sub> σε pH 8, ενώ σε επόμενο στάδιο ακολουθεί η συμπύκνωση της αναδιπλωμένης πρωτεΐνης σε ένα επιθυμητό όγκο περίπου 30ml. Μια δεύτερη αλλαγή buffer λαμβάνει χώρα σε LEW Buffer που αποτελείται από 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl και pH 8.0 όπου και λαμβάνεται η CCNA2 αναδιπλωμένη και προετοιμάζεται για το επόμενο στάδιο του καθαρισμού.

Επιπλέον μελετήθηκαν συνθήκες αναδίπλωσης μέσω του εμπορικού KIT αντιδραστηρίων ρυθμιστικών διαλυμάτων, το "QuickFold™ Protein Refolding KIT" (Athena Environmental Sciences, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στην επόμενη εικόνα παρουσιάζονται οι τύποι των ρυθμιστικών διαλυμάτων. Για την συνέχιση στην εφαρμογή του KIT, έγινε ρύθμιση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης σε 1mg/ml. Αυτές οι 15 συνθήκες ελέγχθησαν στους 4°C και 22°C for overnight αναδίπλωση αναζητώντας την βέλτιστη. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 15,000g για 30'. Η διαλυτή φάση μεταφέρθηκε σε ένα καινούργιο καθαρό eppendorf το οποίο και περιείχε τη ανασυνδυασμένη αναδιπλωμένη CCNA2 πρωτεΐνη. Το ίζημα επίσης ελέγχθηκε για την ύπαρξη αδιάλυτης ή μη αναδιπλωμένης CCNA2.

#### *TCA/Acetone κατακρήμνιση*

Λόγω της ύπαρξης διαφόρων ουσιών από τα πειραματικά byffer για να καθαρίσει η παρατηρούμενη εικόνα από την 12% (w/v) SDS-PAGE ανάλυση, διερευνήθηκε η κατακρήμνισή τους με TCA/Acetone <sup>37</sup>. Με την εφαρμογή αυτή παρεμβαλλόμενες ουσίες όπως αλάτια, πολυφενόλες κ.α. απομακρύνονται από το διάλυμα. Αρχικά μια μικρή ποσότητα διαλύεται σε 6% TCA και ξεπλένεται τρεις φορές με παγωμένη

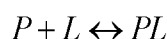
Acetone., μετά τη τελευταία πλύση και φυγοκέντρωση το διάλυμα θερμαίνεται για να απομακρυνθεί όλη η Acetone και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με απιονισμένο H<sub>2</sub>O για να ακολουθήσει ανάλυση σε 12% (w/v) SDS-PAGE.

#### **4. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ CCNA2**

Ο καθαρισμός της ανασυνδυασμένης CyclinA2/6xHis πραγματοποιήθηκε μετά το διαχωρισμό του διαλυτού από το αδιάλυτο κλάσμα και έπειτα με επαναδιαλυτοποίηση σε lysis buffer που περιείχε 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl και 10 mM imidazole σε pH 8.0 με την παρουσία 100 mM PMSF και 1 mg/ml lysozyme. Εφαρμόστηκε η χρωματογραφία συγγένειας Ni-NTA στήλης με προοδευτικές εκλούσεις κλασμάτων, προσαρμόζοντας το πρωτόκολλο του κατασκευαστή στις ανάγκες της εργασίας. Οι δεσμευμένες πρωτεΐνες εκλούστηκαν με διαβάθμιση του buffer έκλουσης, περιλαμβάνοντας 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl και 250 mM imidazole σε pH 8.0. Δείγματα από κάθε στάδιο καθαρισμού μέσω της στήλης ελέγχθηκαν μέσω ηλεκτροφόρησης για να προσδιοριστεί το επίπεδο καθαρότητας του κάθε κλάσματος. Τα κλάσματα που εκλούστηκαν, συγκεντρώθηκαν και συμπυκνώθηκαν μέσω Millipore Centrifugal Filter Units για να αλλάξουν σε buffer για φασματοσκοπία φθορισμού που περιέχει 50 mM Tris σε pH 8.0 και 100 mM MgCl<sub>2</sub>. Κατά την διαδικασία αλλαγής του ρυθμιστικού, η του MgCl<sub>2</sub> αλλάζει αυξάνοντας σταδιακά για να φτάσει την τελική συγκέντρωση, ώστε να αποφευχθεί η κατακρήμνιση της πρωτεΐνης. Τέλος προστίθενται τα NaN<sub>3</sub> και Monothioglycerol με τελικές συγκεντρώσεις από 0.01% το καθένα.

## 5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΑΣ ΔΙΑΣΤΑΣΗΣ (K<sub>d</sub>) ΜΕΣΩ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΗΣ CCNA2

Η σταθερά διάστασης (dissociation constant, K<sub>d</sub>), είναι μια μονάδα μέτρησης για την σύνδεση μεταξύ πρωτεΐνης και ενός υποκαταστάτη. Κατά την αντίδραση αυτή ισχύει:



Σύμφωνα με την παραπάνω εξίσωση, η K<sub>d</sub> μπορεί να υπολογιστεί από την εξίσωση(1):

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]} \quad (1)$$

Όπου [P] είναι η συγκέντρωση της αδέσμευτης πρωτεΐνης, [L] είναι η συγκέντρωση του ασύνδετου υποκαταστάτη και [PL] είναι η συγκέντρωση του συμπλόκου πρωτεΐνης-υποκαταστάτη.

Διαφορές στην ένταση φθορισμού στα 345 nm μεταξύ του συμπλόκου Cyclin A2/5921 και της ελεύθερης πρωτεΐνης (που διεγείρει στα 295 nm) έχουν προσδιοριστεί όπως έχει περιγραφεί <sup>22</sup> (Eq. 2), προκειμένου να καθοριστεί η σταθερά ιοντισμού (K<sub>d</sub>) της ανασυνδυασμένης cyclin A2 με 5921:

$$(2) \quad F_{obs} = F_{BG} + MF_{P_F} [P_F] + FR \cdot MF_{P_F} \cdot \frac{([L_T] + [P_T] + K_d) \pm \sqrt{([L_T] + [P_T] + K_d)^2 - 4[P_L][L_T]}}{2}$$

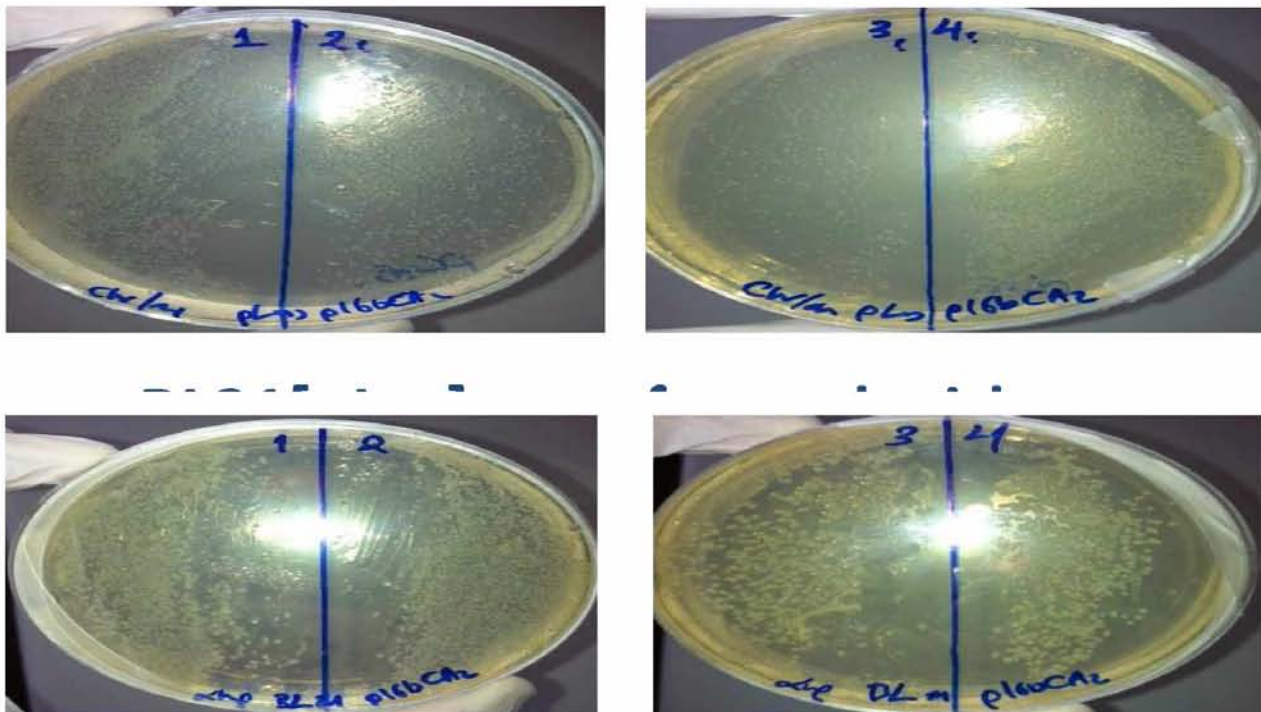
$F_{\text{obs}}$  είναι η παρατηρούμενη is η ένταση φθορισμού,  $F_{\text{BG}}$  είναι το σήμα στο προσκήνιο του φθορισμού,  $MF_{\text{P}}$  και  $P_{\text{F}}$  είναι ο μοριακός φθορισμός και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης αντίστοιχα. Ο FR είναι ο λόγος του φθορισμού της δεσμευμένης πρωτεΐνης. Οι  $L_{\text{T}}$  και  $P_{\text{T}}$  είναι ολικές συγκεντρώσεις του ligand και της πρωτεΐνης, αντίστοιχα.

Η ένταση του φθορισμού μετρήθηκε με το Hitachi F-2500 φασματοφωτόμετρο φθορισμού σε κυψελίδες χαλαζία 0,4 x 1 cm στους 25°C. Τα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής ήταν 295nm και 345 nm αντίστοιχα. Οι σχισμές της διέγερσης και εκπομπής καθορίστηκαν αντίστοιχα στα 5 και 20 nm. Για την ανάλυση σύνδεσης της 6xHis-CyclinA2 με το ligand 5921, οι μετρούμενες εντάσεις διορθώθηκαν για το μαύρο σήμα. Για την πειραματική διαδικασία, 1.5 ml διαλύματος πρωτεΐνης από 0.1 έως 0.65  $\mu\text{M}$  συγκέντρωσης, αφήνεται να ισορροπήσει σε κυψελίδα στους 25°C για 1 ώρα. Μετά την εξισορρόπηση, μικρές προσθήκες (από 2 έως 10  $\mu\text{l}$ ) του διαλύματος των ligand εισάγονται στο διάλυμα της πρωτεΐνης και αφήνεται να πραγματοποιηθεί η σύνδεση μεταξύ τους <sup>38</sup> για 2 λεπτά όπου και γίνεται η μέτρηση της έντασης φθορισμού. Τα πειράματα διενεργήθηκαν με το προαναφερθέν buffer φθορισμού. Προκειμένου να καθοριστεί η ακριβής επίδρασης αραίωσης και μόνο με τη σύνδεση λόγω της προσθήκης του ligand και όχι αποτέλεσμα φθορισμού λόγω ασύνδετου ligand, ένα τυφλό δείγμα που περιέχει τρυπτοφάνη με σήμα φθορισμού παρόμοιου επιπέδου, τιτλοδοτείται με προσθήκη της ίδιας ποσότητας ligand. Η απορροφητικότητα του δείγματος συγκρατήθηκε κάτω από το 0.1 ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι επιδράσεις από το εσωτερικό φίλτρο (J.R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, 1999). Οι αντιδράσεις δέσμευσης των Kds, αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό πρόγραμμα Prism (GraphPadSoftware, Σαν Ντιέγκο, CA).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

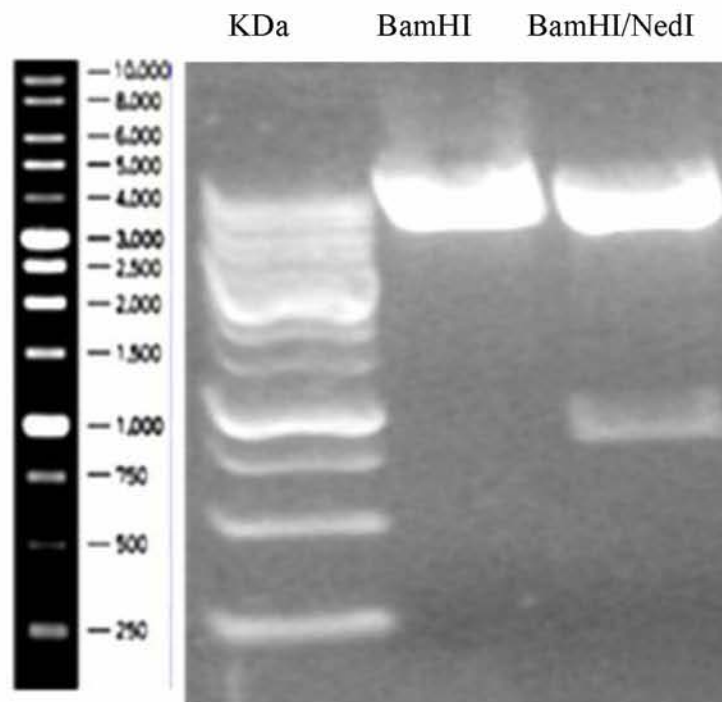
### 1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΙΑ ΕΠΙΤΥΧΗ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΚΑΙ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΑΝΑΣΥΝΔΥΣΜΕΝΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ

Δημιουργήθηκαν τέσσερα τριβλία με θρεπτικό και τα αντίστοιχα θρεπτικά για την πειραματική διαδικασία, όπου αντιστοιχούν σε δύο ανά στέλεχος για τα BL21 (DE3) και BL21 (DE3) pLysS. Η ανάπτυξη στους 37°C διαρκεί περίπου για 16-24 ώρες σε θάλαμο επώαση των τριβλίων με τα μετασχηματισμένα βακτήρια. Τα βακτήρια που μετασχηματίστηκαν με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο θα αναπτυχθούν λόγω παρουσίας του αντιβιοτικού στο θρεπτικό υλικό, έναντι των βακτηρίων που δεν το έλαβαν. Η εικόνα που πήραμε φαίνεται παρακάτω.



Εικόνα 20. Μετασχηματισμένα βακτήρια με το pET16b-CA2. Επάνω: Τα BL21 (DE3) pLysS με τα αντιβιοτικά Amp/Chr. Κάτω: Τα BL21 (DE3) με το αντιβιοτικό Amp.

Η ανίχνευση και ταυτοποίηση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου, πραγματοποιήθηκε με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού *NdeI* και *BamHI* που κόβουν τις αλληλουχίες σε συγκεκριμένα σημεία σύμφωνα με το πλασμιδιακό χάρτη. Η ανάλυση των προϊόντων DNA έγινε σε 1% αγαρόζη (TBEX1).

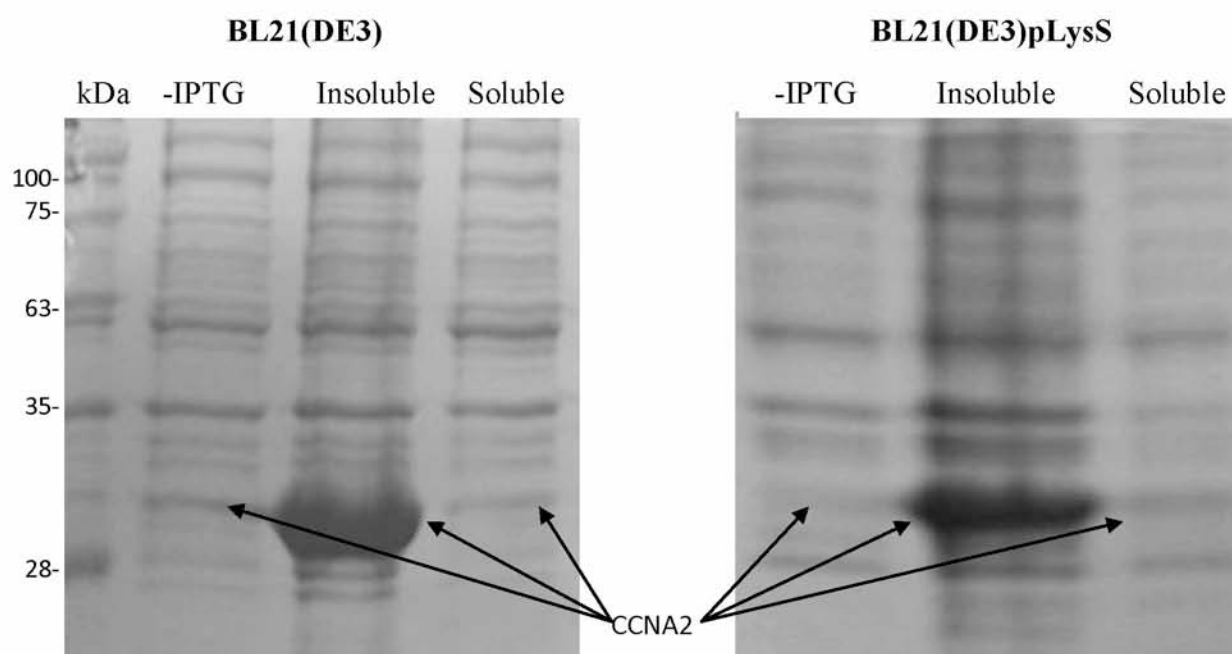


Εικόνα 21. Η πέψη, των μετασχηματισμένων βακτηρίων *E. coli* με pET16b-CA2, με τα ένζυμα περιορισμού και ανάλυσης των ζωνώσεων που προκύπτουν σε 1% αγαρόζη.



## 2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ CCNA2

Η CCNA2, δοκιμάστηκε αρχικά και για τα δύο στελέχη **BL21(DE3)** και **BL21(DE3)pLysS** για το προφίλ έκφρασής της και τον έλεγχο διαλυτότητάς της χωρίς και με επαγωγή. Όπως φαίνεται και στην εικόνα παρακάτω, στην πρώτη στήλη, και τα δύο στελέχη εκφράζουν την CCNA2 (χωρίς επαγωγή με IPTG, -IPTG). Ωστόσο η χαμηλή παραγωγή διαλυτής πρωτεΐνης εμφανίζεται στις δύο επόμενες στήλες όπου στο διαλυτό κλάσμα (soluble) η ένταση της ζώνης είναι πολύ αχνή σε σχέση με τη ζώνη που εμφανίζεται στο αδιάλυτο κλάσμα (insoluble). Το αδιάλυτο κλάσμα αποτελεί και την ένδειξη της συσσώρευσης της μείζονος ποσότητας της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, στα σωματίδια εγκλεισμού.



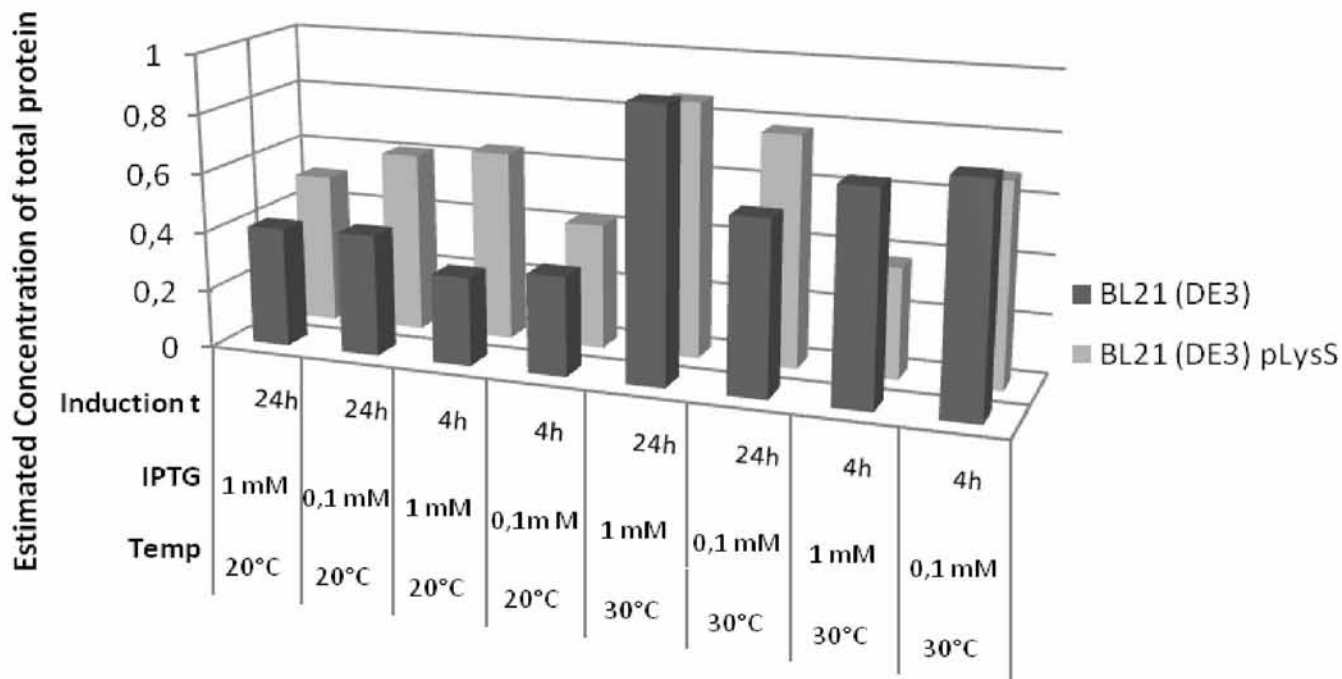
Εικόνα 22. Το προφίλ της CCNA2. Οι συνθήκες έκφρασης με επαγωγή είναι οι 25°C, 0.1mM IPTG για 4h και ανάλυση σε 12% (w/v) SDS-PAGE.

### 3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΕΛΤΙΣΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΠΕΡ-ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ CCNA2

Η ανάλυση με ηλεκτροφόρηση έδειξε ίχνη έως και απουσία της πρωτεΐνης στο κυτόπλασμα του βακτηρίου μετά τη λύση του. Αντ' αυτού εντοπίζεται κυρίως στο αδιάλυτο κλάσμα. Αυτό φαίνεται να υποστηρίζεται και από τη στατιστική ανάλυση του μοντέλου, μέσω λογισμικού προγράμματος (<http://biotech.ou.edu>), του τμήματος της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης πρωτεΐνης CCNA2 που κλωνοποιήθηκε (UniProtKB/Swiss-Prot P20248) για υπερέκφραση, κάνοντας μια στοχαστική πρόβλεψη στο 18.4% πιθανότητας για να βρεθεί σε διαλυτή μορφή μέσα στο *E. coli* (παράρτημα).

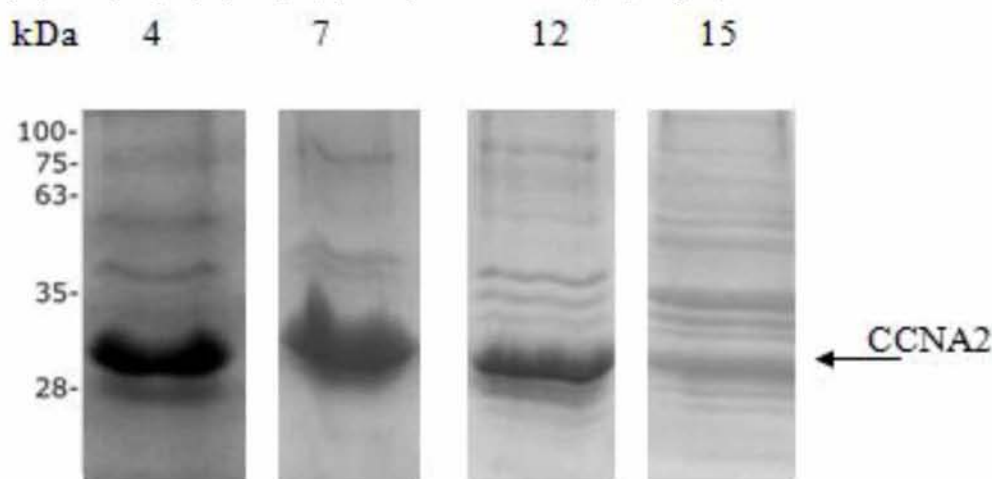
Στην αναζήτηση των συνθηκών για τη βελτιστοποίηση της έκφρασης της CCNA2 στο αδιάλυτο κλάσμα καθώς η ποσότητα στο διαλυτό κλάσμα κρίθηκε σημαντικά χαμηλή, χρησιμοποιήθηκε, για τη πειραματική διαδικασία ένας κεντρικός σχεδιασμός, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως. Οι μεταβλητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα δύο στελέχη BL21(DE3) και BL21(DE3)pLysS, η συγκέντρωση επαγωγής με IPTG (0.1 και 1 mM), η θερμοκρασία επαγωγής (στους 20°C και 30°C) και η διάρκεια της επαγωγής (4 ώρες και 24 ώρες).

Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την ανάλυση αλλά και τον προσδιορισμό την ολικής συγκέντρωσης (διαλυτής και αδιάλυτης) πρωτεΐνης σε κάθε ένα από τους συνολικού 32 συνδυασμούς των μεταβλητών (16/στέλεχος), παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα. Ο υπολογισμός έγινε με τη μέθοδο Bradford, με απορρόφηση στα 595 nm. Οι μετρήσεις έγιναν με βάση τη πρότυπη καμπύλη αναφοράς με γνωστές ποσότητες αλβουμίνης ορού βοδιού (BSA). Η εξίσωση της πρότυπης καμπύλης που χρησιμοποιήθηκε είναι η  $y=0,014x+0,023$  (στο παράρτημα παρουσιάζεται και η καμπύλη της εξίσωσης).



Εικόνα 23. Το προφίλ της CCNA2. Οι συνθήκες έκφρασης με επαγωγή είναι οι 25°C, 0.1mM IPTG για 4h και ανάλυση σε 12% (w/v) SDS-PAGE.

Ενδεικτικά παρακάτω εμφανίζεται η έκφραση σε τέσσερα από τα συνολικά 16 δείγματα για κάθε στέλεχος (όπως παρουσιάστηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο), όπως φαίνεται σε ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδαμίδιου, 12% (w/v) SDS-PAGE (το σύνολο των εικόνων από τις ηλεκτροφορήσεις εμφανίζεται στο παράρτημα).



Εικόνα 24. Οι συνθήκες της εικόνας είναι:

**No. 4** BL21 (DE3) 0.1 M IPTG, 4 h incubation time at 20 °C.

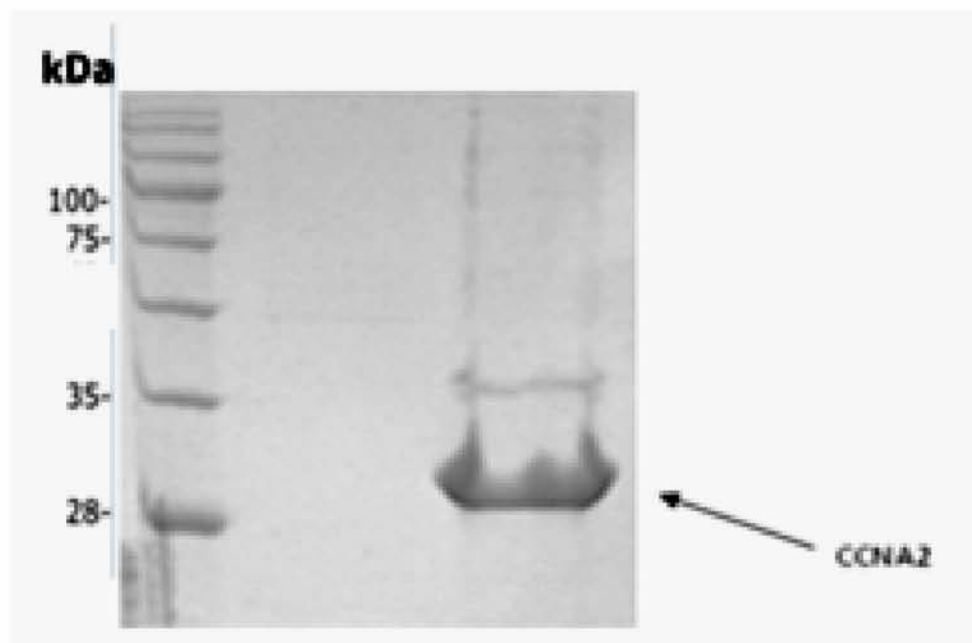
**No. 7** BL21 (DE3) 1 M IPTG, 4 h incubation time at 30 °C,

**No. 12** BL21 (DE3) pLysS 0.1 M IPTG, 4 h incubation time at 20 °C και

**No. 15** BL21 (DE3) pLysS 1 M IPTG, 4 h incubation time at 30 °C

Από την παραπάνω εικόνα φαίνεται μια σταδιακή μείωση της έντασης της ζώνης από το δείγμα 4 και μετά. Σε συνδυασμό και με τα ποσοτικά αποτελέσματα, κρίθηκε αναγκαία η ανάλυση των εικόνων ηλεκτροφόρησης που έγινε μέσω του λογισμικού προγράμματος GelQuant.NET (από τη [www.biochemlabsolutions.com](http://www.biochemlabsolutions.com)). Με το πρόγραμμα αυτό υπολογίστηκε η ποσότητα της CCNA2 (μέσω της έντασης της ζώνης), από τη συνολική πρωτεΐνη (το σύνολο των ζωνών που εμφανίζονται).

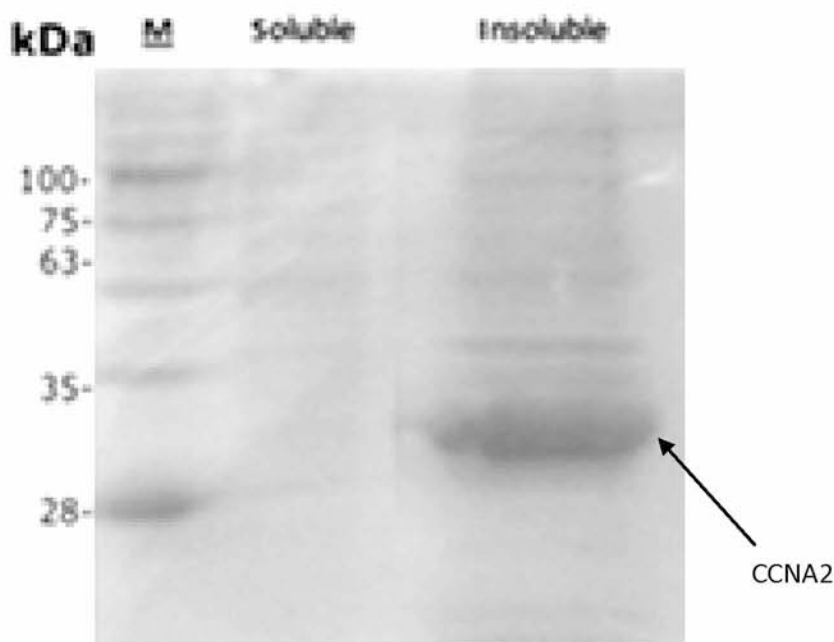
Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής έδειξαν ότι το στέλεχος που είχε την μεγαλύτερη και ποιοτικότερη συγκριτικά έκφραση είναι το BL21 (DE3) σύστημα έκφρασης για την ανασυνδυασμένη CCNA2, από ότι το προφίλ που έδειξε το BL21(DE3)pLysS. Οι βέλτιστες συνθήκες υπερέκφρασης προσδιορίστηκαν στους 20°C, με 0.1 mM IPTG επαγωγή και χρονική περίοδο επαγωγής τις 12h μέχρι τη συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρωση.



Εικόνα 25. Οι βέλτιστες συνθήκες υπερέκφρασης για την CCNA2, 25°C, 0.1mM IPTG για 12h και ανάλυση σε 12% (w/v) SDS-PAGE.

#### 4. ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ ΤΗΣ CCNA2 ΑΠΟ ΤΑ ΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ

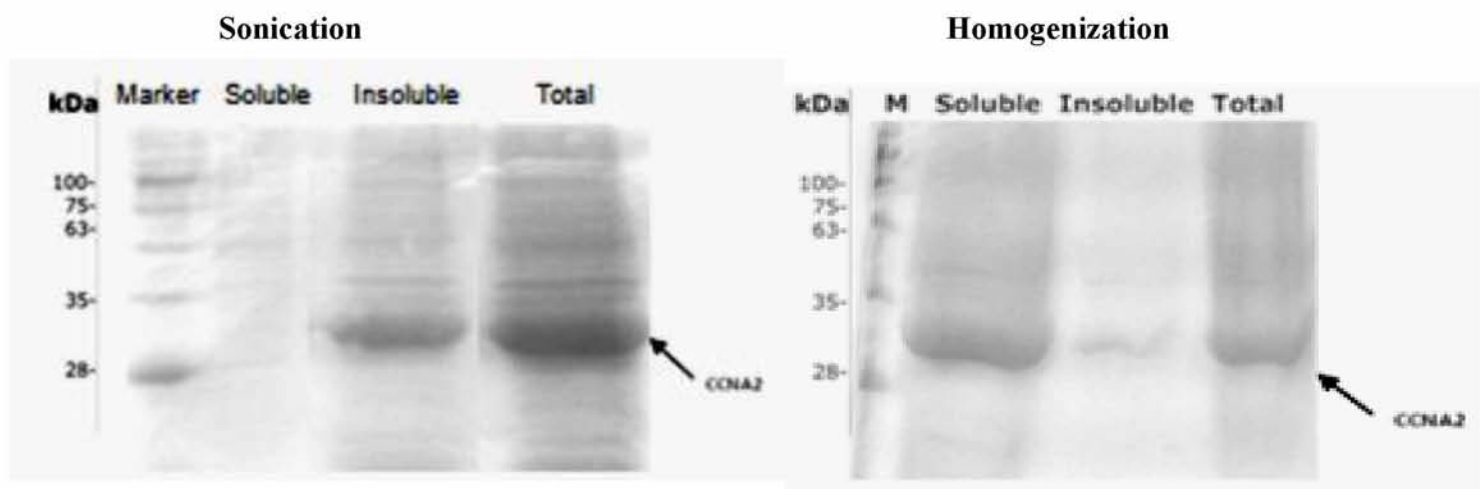
Η έλλειψη παρουσίας διαλυτού κλάσματος της CCNA2, όπως αναφέρθηκε, συμβαίνει εξαιτίας της συγκέντρωσης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης κατά την υπερέκφρασή της, στα σωματίδια εγκλεισμού. Κατά τις βέλτιστες συνθήκες υπερέκφρασης στους 20°C, 1 mM IPTG και 12h επαγωγής της CCNA2 στο BL21 (DE3) με pET16b-CCNA2, παρουσιάζεται, μια κυρίαρχη ζώνη στο αδιάλυτο κλάσμα και έλλειψη στο διαλυτό κλάσμα. Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται οι διαφορές



Εικόνα 26. Η κυρίαρχη ζώνη εμφανίζει την CCNA2 εγκλωβισμένη μέσα στα σωματίδια εγκλεισμού και σχεδόν απουσιάζει από το διαλυτό κλάσμα. Η ανάλυση σε 12% (w/v) SDS-PAGE.

Μέσω της πειραματική διαδικασίας δοκιμάστηκαν η μηχανική μέθοδος μέσω ομογενοποίησης (homogenization) και η τεχνική μέσω υπερήχων (sonication). Σκοπός ήταν η διερεύνηση για εκείνη τη μέθοδο που θα έδινε τη μεγαλύτερη ανάκτηση διαλυτής CCNA2 από τα σωματίδια

εγκλεισμού (inclusion bodies). Πραγματοποιώντας τις μεθόδους με τον τρόπο που περιγράφηκαν νωρίτερα, παρατηρήθηκε υψηλότερο ποσοστό ανάκτησης της πρωτεΐνης με τη μέθοδο της ομογενοποίησης από ότι με την ακίδα υπερήχων. Τα προφίλ και των δύο μεθόδων παρουσιάζονται στη παρακάτω εικόνα.



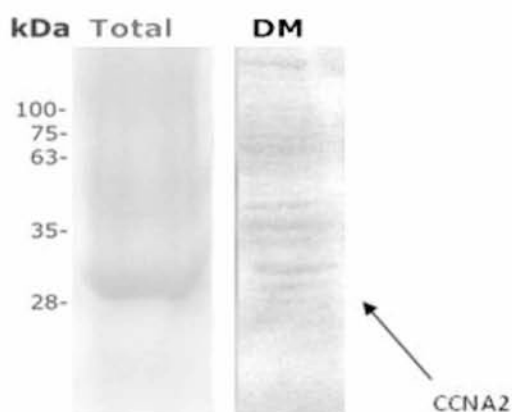
Εικόνα 27. Η σύγκριση μεταξύ των μεθόδων. Η κυρίαρχη ζώνη εμφανίζει την CCNA2 εγκλωβισμένη μέσα στα σωματίδια εγκλεισμού και σχεδόν απουσιάζει από το διαλυτό κλάσμα. Η ανάλυση σε 12% (w/v) SDS-PAGE.



## 5. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΑΝΑΔΙΠΛΩΣΗΣ ΤΗΣ CCNA2 (Refolding)

Η διαδικασία ανάκτησης της πρωτεΐνης από τα σωματίδια εγκλεισμού, και με εφαρμογή των διαλυμάτων 8 M Urea solution και 6 M Guanidine-HCl για συγκριτικούς λόγους, είχε ως αποτέλεσμα την αποδιάταξή της. Έπρεπε λοιπόν να επαναφερθεί η CCNA2 σε αναδιπλωμένη κατάσταση και με ενεργή δομή.

Αρχικά δοκιμάστηκε η διαδικασία της Διαπίδυσης (Dialysis method) με 0.1 M Tris, 0.5 M L-Arginine και 0.33 M GSSG σε pH=8,5 και με ρύθμιση τελικού όγκου έτσι ώστε η συγκέντρωση της CCNA2 να υπολογίζεται σε 0,1mg/ml. Με την διαδικασία που περιγράφηκε σε προηγούμενο τμήμα, η ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε 12% (w/v) SDS-PAGE, έδειξε σημαντική απώλεια ποσότητας της CCNA2 με τη μέθοδο αυτή.



Εικόνα 28. Η μέθοδος Διαπίδυσης (Dialysis method, DM). Η αρχική ποσότητα που πριν την εφαρμογή της μεθόδου και η ποσότητα που παρέμεινε μετά την αναδίπλωσή της.

Οι συνθήκες αναδίπλωσης της διαλυτής ανασυνδυασμένης CCNA2 στο BL21 (DE3) με pET16b-CyclinA2, διερευνήθηκαν και μέσω του εμπορικού KIT "QuickFold™ Protein Refolding KIT" για 15 διαφορετικές συνθήκες. Οι συνθήκες αφορούν μια ποικιλία τύπων

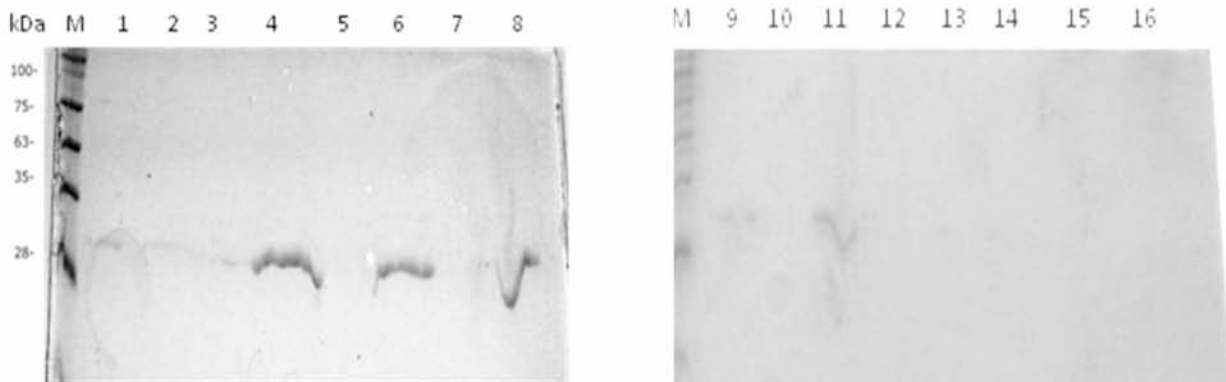
ρυθμιστικών διαλυμάτων όπου προωθείται η αναδίπλωση για να πάρει την ενεργή μορφή της. Οι διάφορες συνθήκες των ρυθμιστικών διαλυμάτων εμφανίζονται παρακάτω στο πίνακα.

Πίνακας 4. Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την αναδίπλωση

|                  |  |
|------------------|--|
| <b>Buffer 1</b>  | 50 mM MES pH 6.0, 9.6 mM NaCl, 0.4 mM KCl, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 0.75 M Guanidine HCl, 0.5% Triton X-100, 1 mM DTT   |
| <b>Buffer 2</b>  | 50 mM MES pH 6.0, 9.6 mM NaCl, 0.4 mM KCl, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 0.5 M arginine, 0.05% polyethylene glycol 3,550, 1 mM GSH, 0.1 mM GSSH  |
| <b>Buffer 3</b>  | 50 mM MES pH 6.0, 9.6 mM NaCl, 0.4 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.4 M sucrose, 0.75 M Guanidine HCl, 0.5% Triton X-100, 0.05% polyethylene glycol 3,550, 1 mM DTT  |
| <b>Buffer 4</b>  | 50 mM MES pH 6.0, 240 mM NaCl, 10 mM KCl, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 0.5 M arginine, 0.5% Triton X-100, 1 mM GSH, 0.1 mM GSSH   |
| <b>Buffer 5</b>  | 50 mM MES pH 6.0, 240 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.4 M sucrose, 0.75 M Guanidine HCl, 1 mM DTT   |
| <b>Buffer 6</b>  | 50 mM MES pH 6.0, 240 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.5 M arginine, 0.4 M sucrose, 0.5% Triton X-100, 0.05% polyethylene glycol 3,550, 1 mM GSH, 0.1 mM GSSH  |
| <b>Buffer 7</b>  | 50 mM MES pH 6.0, 240 mM NaCl, 10 mM KCl, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 0.75 M Guanidine HCl, 0.05% polyethylene glycol 3,550, 1 mM DTT  |
| <b>Buffer 8</b>  | 50 mM Tris-Cl pH 8.5, 9.6 mM NaCl, 0.4 mM KCl, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 0.4 M sucrose, 0.5% Triton X-100, 0.05% polyethylene glycol 3,550, 1 mM GSH, 0.1 mM GSSH                                      |
| <b>Buffer 9</b>  | 50 mM Tris-Cl pH 8.5, 9.6 mM NaCl, 0.4 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.5 M arginine, 0.75 M Guanidine HCl, 0.05% polyethylene glycol 3,550, 1 mM DTT  |
| <b>Buffer 10</b> | 50 mM Tris-Cl pH 8.5, 9.6 mM NaCl, 0.4 mM KCl, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 0.5 M arginine, 0.4 M sucrose, 0.75 M Guanidine HCl, 1 mM GSH, 0.1 mM GSSH  |
| <b>Buffer 11</b> | 50 mM Tris-Cl pH 8.5, 9.6 mM NaCl, 0.4 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 1 mM DTT  |
| <b>Buffer 12</b> | 50 mM Tris-Cl pH 8.5, 240 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.05% polyethylene glycol 3,550, 1 mM GSH, 0.1 mM GSSH  |
| <b>Buffer 13</b> | 50 mM Tris-Cl pH 8.5, 240 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.5 M arginine, 0.75 M Guanidine HCl, 0.5% Triton X-100, 1 mM DTT   |
| <b>Buffer 14</b> | 50 mM Tris-Cl pH 8.5, 240 mM NaCl, 10 mM KCl, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 0.5 M arginine, 0.4 M sucrose, 0.75 M Guanidine HCl, 0.5% Triton X-100, 0.05% polyethylene glycol 3,550, 1 mM GSH, 0.1 mM GSSH |
| <b>Buffer 15</b> | 50 mM Tris-Cl pH 8.5, 240 mM NaCl, 10 mM KCl, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 0.4 M sucrose, 1 mM DTT  |

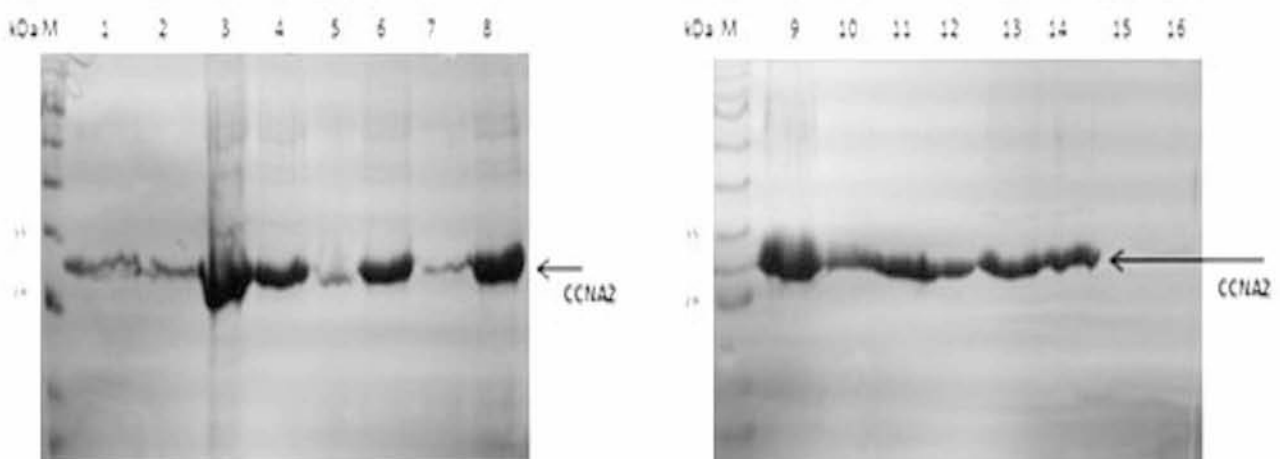


Η ανάλυση των προϊόντων έδειξε, όπως φαίνεται και στη παρακάτω εικόνα, αυξημένη έντασης ζώσης δίνοντας καλύτερη εικόνα όταν στο ρυθμιστικό περιέχονταν GSH/GSSH από ότι DTT.



Εικόνα 29. Η ανάλυση μετά τη δοκιμασία αναδίπλωσης της CCNA2. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στο εκάστοτε ρυθμιστικό διάλυμα όπως αυτά εμφανίζονται στον παραπάνω πίνακα.

Αυτή η παρατήρηση επιβεβαιώθηκε εκ νέου μέσω της δοκιμασίας κατακρήμνισης με TCA/Acetone. Η ανάλυση για τα ίδια δείγματα έγινε με ηλεκτροφόρηση σε 12% (w/v) SDS-PAGE.



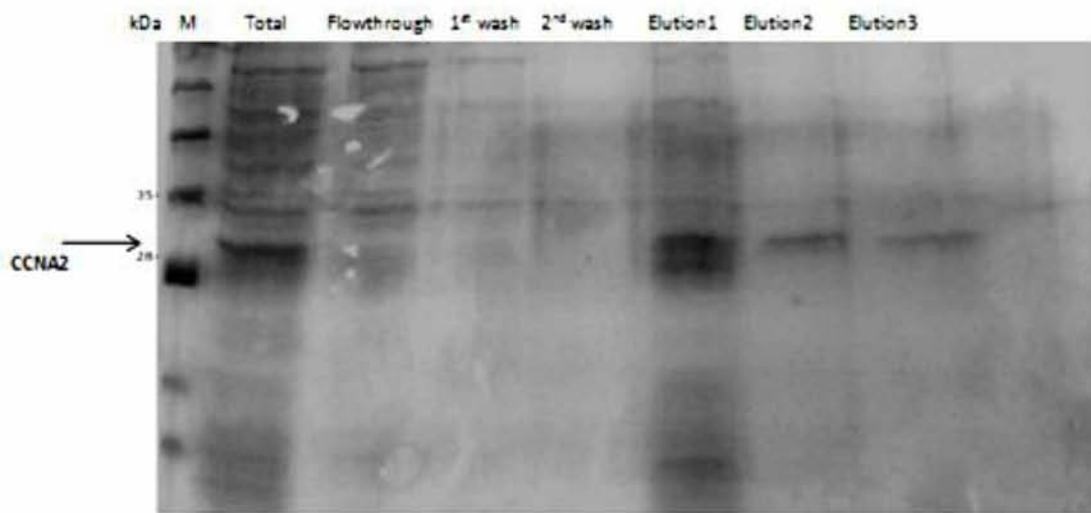
Εικόνα 29. Η ανάλυση μετά την επεξεργασία των δειγμάτων με TCA/ACETONE.

Από τη πειραματική διαδικασία, ο τύπος του ρυθμιστικού διαλύματος που κρίθηκε ο καταλληλότερος για την επιτυχή αναδίπλωση της CCNA2 αποτελείται από 50 mM MES και pH=6 με 240 mM NaCl, 10 mM KCl, 1mM EDTA, 0.5 M arginine, 0.4 M Sucrose, 0.5% Triton X-100, 0.05% polyethylene glycol 3550 , 1 mM GSH και 0.1 mM GSSH. Η καθαρισμένη και αναδιπλωμένη ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη CCNA2 αποθηκεύτηκε στους 4°C για τις επιπλέον ποιοτικές μελέτες.

Όπως θα δειχτεί και παρακάτω, η σταθερότητα της CCNA2 επιτυγχάνεται (είτε χρησιμοποιηθεί η μέθοδος διαπίδυσης είτε η διερευνητική αναδίπλωση) μέσω αυξανόμενης συγκέντρωσης από MgCl<sub>2</sub>.

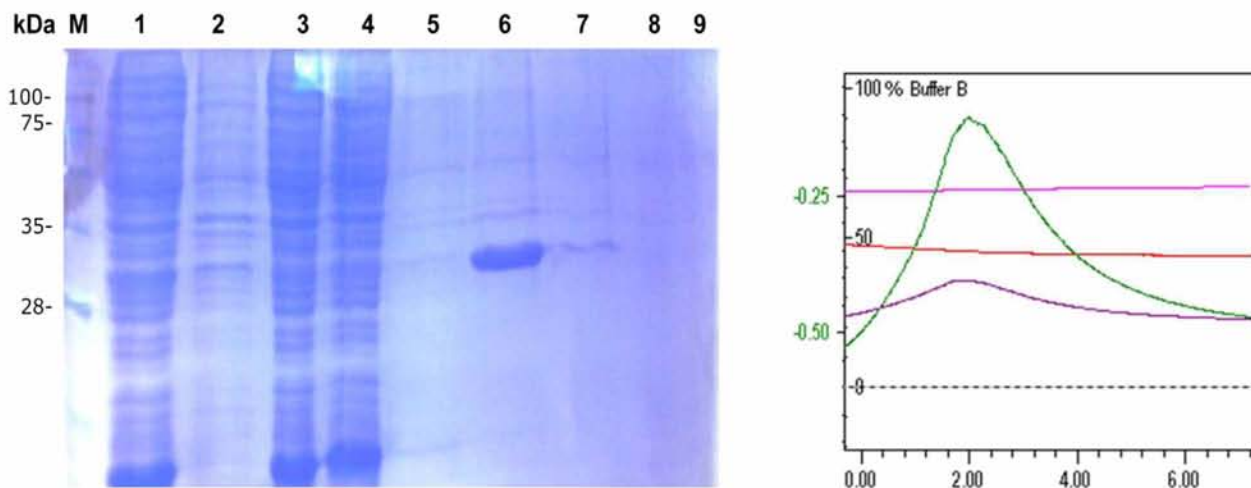
## **6. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΣΕ ΜΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΤΗΣ 6xHis-CCNA2 (Native Conditions)**

Για να γίνει εκτίμηση αν η καθαρή και ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη παραμένει διαλυτή στο διάλυμα πραγματοποιήθηκε δοκιμασία μέσω της στήλης Protino® Ni-TED Packed Columns – purification under native conditions. Η διαδικασία διεξήχθη σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με το ρυθμιστικό Lew και το pH ρυθμίστηκε στο 8.0. Η ανάλυση έγινε με ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων έκλουσης σε 12% (w/v) SDS-PAGE. Η υψηλή καθαρότητας και απομονωμένη από άλλες ουσίες, ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη εμφανίζεται στην παρακάτω εικόνα στο δεύτερο και τρίτο κλάσμα. Η χρήση της τεχνικής αυτής προέβλεψε το στάδιο εμφάνισης της 6His-CCNA2 για τον καθαρισμό της σε μεγάλη κλίμακα χρησιμοποιώντας την στήλη χρωματογραφίας συγγένειας IMAC-Ni<sup>2+</sup> σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.



Εικόνα 30. Η ανάλυση με ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων έκλουσης από τη στήλη Protino® Ni-TED Packed Columns.

Κατά τη πειραματική διαδικασία και την εφαρμογή της στήλης χρωματογραφίας συγγένειας IMAC-Ni<sup>2+</sup>, με ανάλυση των κλασμάτων με ηλεκτροφόρηση, επιβεβαιώθηκε η εμφάνιση της 6His-CCNA2 στο δεύτερο και τρίτο κλάσμα κατά τον καθαρισμό.



Εικόνα 31. BL21 με pET16b-CyclinA2 /3h περίπου επώαση στους 25°C με 0.5 mM IPTG. Η ανάλυση με ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων έκλουσης από τη στήλη Protino® Ni-TED Packed Columns.

Γραμμές της ηλεκτροφόρησης

- |                                      |                 |
|--------------------------------------|-----------------|
| M: Pre stained Markers               | 4. Washing step |
| 1. 25°C 1mM +IPTG pellet             | 5. Elution 1    |
| 2. Soluble fraction after sonication | 6. Elution 2    |
| 3. Flow through Ni-NTA               | 7. Elution 3    |

## 7. ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ ΤΗΣ 6xHis-CCNA2

Η διατήρηση της διαλυτότητας πολλών πρωτεϊνών, επιτυγχάνεται με την παρουσία στο διάλυμα των  $Mg^{2+}$  ή  $Ca^{2+}$ . Για να γίνει εκτίμηση αν η καθαρή και ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη παραμένει διαλυτή στο διάλυμα και να αποτραπεί η κατακρήμνιση της η 6xHis-CyclinA2 παρέμεινε σε διάλυμα Tris buffer που περιείχε 100 mM  $MgCl_2$  όπως περιγράφηκε στις μεθόδους. Η αυξανόμενη αυτή συγκέντρωση  $MgCl_2$  στο διάλυμα της πρωτεΐνης από 10 σε 100 mM, έδωσε τη σταθερότητα και διατήρηση της διαλυτότητας της πρωτεΐνης CCNA2 στο διάλυμα. Αυτό είναι σημαντικό για την διερεύνηση της σταθεράς διάστασης (Kd) που επιχειρήθηκε σε επόμενο στάδιο, καθώς και για τις προσπάθειες κρυσταλλογράφησης.

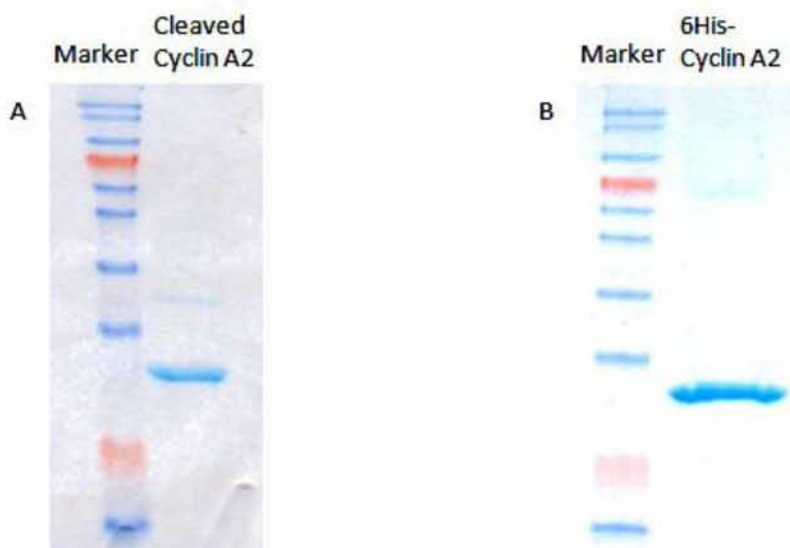
## 8. ΠΕΨΗ ΜΕ ΤΕΝ ΠΡΩΤΕΑΣΗ

Ωστόσο εδώ πρέπει να αναφερθεί ότι κατά τη πειραματική διαδικασία παρατηρήθηκε ενίοτε μια διακύμανση στη ένταση φθορισμού που σχετίστηκε με την His-tag αλληλουχία του αμινοτελικού άκρου της CCNA2. Με την αποκοπή του άκρου οι διακυμάνσεις αυτές δεν παρατηρήθηκαν. Η αποκοπή αυτή πραγματοποιήθηκε με την TEV πρωτεάση.

Για την πέψη της ουράς ιστιδίνης της 6xHis-CyclinA2, τα κύτταρα αμέσως μετά την συλλογή από την υπερέκφραση, επεξεργάστηκαν με το lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5mM  $MgCl_2$ , 10% glycerol, 1 mM DTT, 0.1mM PMSF, 1 mg/ml lysozyme). Μετά από τις τεχνικές λύσης των κυττάρων και των σωματιδίων εγκλεισμού, το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε και το καθαρό από λυσοζύμη διάλυμα

φορτώθηκε άμεσα στην στήλη Ni-IMAC (η οποία προηγουμένως είχε εξισορροπηθεί με το wash buffer 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glycerol, 1 mM DTT, 0.1mM PMSF και η πρωτεΐνη που συνδέθηκε στη στήλη ιοντοανταλλαγής εκλούστηκε με το elution buffer 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glycerol, 1 mM DTT, 0.1mM PMSF, 400 mM imidazole. Το προφίλ την εκλουσμένης πρωτεΐνης υπολογίστηκε στα 280nm και τα κλάσματα αναλύθηκαν με 12% SDS-PAGE.

Μετά την πέψη με την πρωτεάση TEV σε RT κατά τη νύχτα, το διάλυμα με την πρωτεΐνη φορτώθηκε και πάλι στη στήλη Ni-IMAC με wash buffer εξισορρόπησης 37.5 mM Tris-HCl pH 7.2, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glycerol, 1 mM DTT, 20 mM imidazole. Η ζητούμενη πρωτεΐνη θα πρέπει, όπως και εμφανίζεται στο πρώτο κλάσμα έκλουσης (flowthrough) και η ανάλυση και σύγκριση έγινε με 12% SDS-PAGE.

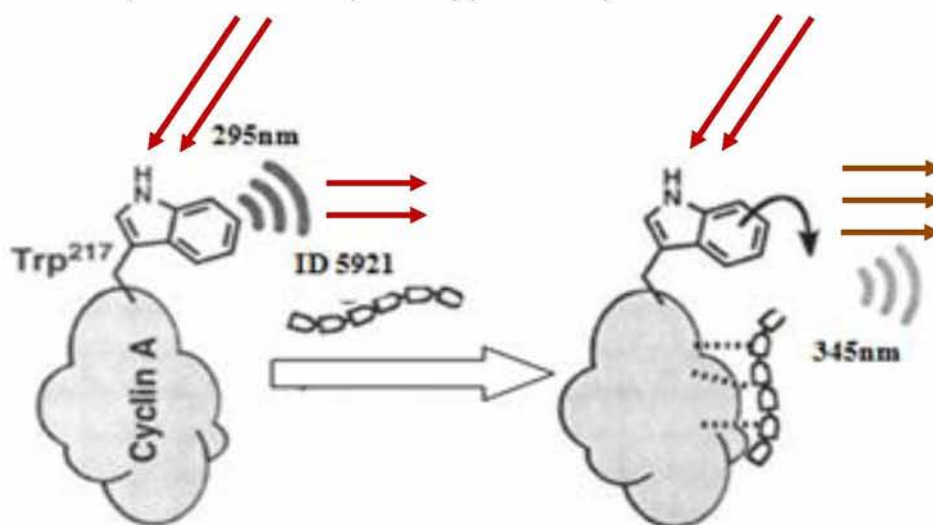


Εικόνα 32. (Α) Ο καθαρισμός της CCNA2 μετά από την πέψη.  
B) Ο καθαρισμός της 6His- Cyclin A2.

## 9. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Η σταθερότητα και η αναστολή της πρωτεΐνης, προσδιορίστηκε από τη σταθερά διάστασης (Kd) μέσω τιτλοδότησης με φασματοσκοπία φθορισμού κατά τη δέσμευσή της σε υποκαταστάτες και μελετώντας τη σχετική ενεργότητα της αναδιπλωμένης CCNA2 σε συνάρτηση με την ανάκτησή της.

Η πειραματική διαδικασία στηρίχθηκε στην τιτλοδότηση φασματοσκοπίας φθορισμού τρυπτοφάνης. Οι τιμές ακολουθούν την σταδιακή (ή όχι) κάλυψη των θέσεων της τρυπτοφάνης της CCNA2, κατά τη εισαγωγή του υποκαταστάτη (ligand) μετρώντας την μεταβολή στην απορρόφηση. Η χρήση της πρωτεΐνης για τις μελέτες αυτές έγινε στο buffer όπως αυτό αναλύθηκε στις μεθόδους.



Εικόνα 33. Ο στόχος του ligand στο CBG, και κάλυψη της θέσης της Try217.

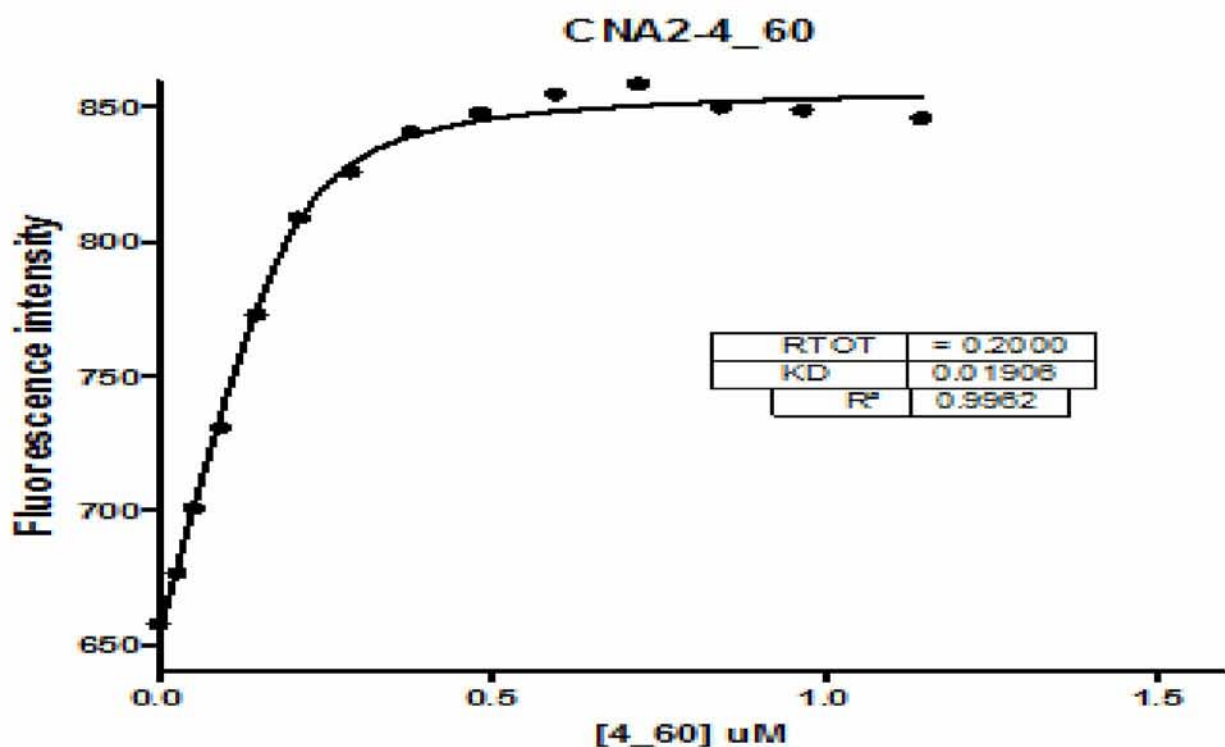
Για την διεξαγωγή της μελέτης, το μήκος κύματος διέγερσης καθορίστηκε στα 295nm και της εκπομπής στα 345nm



Πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις για τους ligands 4-60 και 5921 όσων αφορά στη διαλυτή CCNA2 και στη CCNA2 που προέκυψε από τα σωματίδια εγκλεισμού.

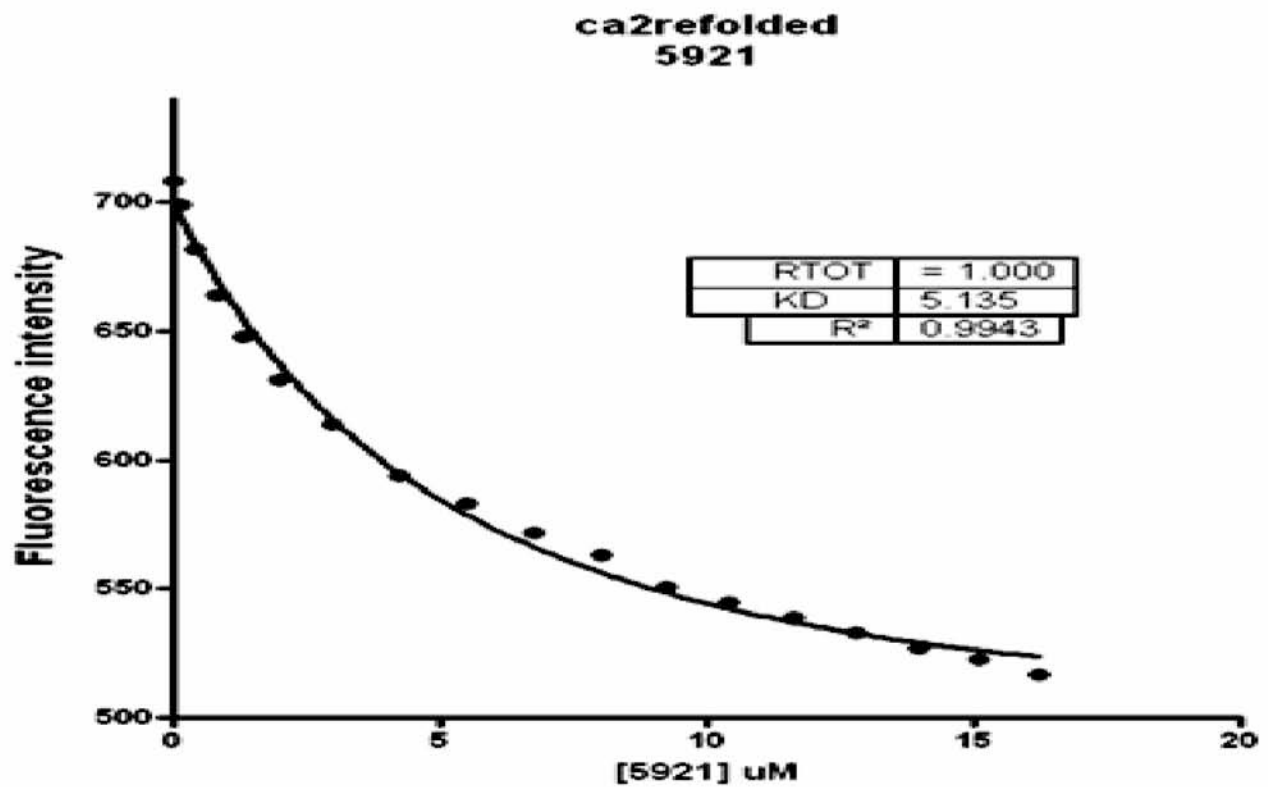
Ο αναστολέας 4-60 που εξετάστηκε στους 25°C, αποτελείται από την ακολουθία αμινοξέων την HAKRRLIF.

Η αρχική συγκέντρωση της CCNA2 ήταν 0.2 Mm <sup>39</sup>. Η τελική συγκέντρωση του πεπτιδίου-αναστολέα έφτασε τα 1.54 μM. Η Kd υπολογίστηκε στα 0.02 μM, αποκαλύπτοντας ενεργότητα δέσμευσης αντίστοιχη με τη βιβλιογραφία.



Εικόνα 34. Η ανάλυση της Kd του αναστολέα L4-60.

Ο αναστολέας 5921 επιλέχθηκε για την τιτλοδότηση της αναδιπλωμένης CCNA2 στους 25°C και η δραστηριότητα που έδειξε εμφανίζεται στην παρακάτω εικόνα, με  $K_d$  5.135.



Εικόνα 35. Η δραστηριότητα του φορτισμού της αναδιπλωμένης CCNA2, μελετώντας την με τον 5921 ligand.

Τα επίπεδα ενεργότητας εμφανίζονται στην ίδια τάξη μεγέθους, αλλά σε σχετικά χαμηλότερα επίπεδα από τη διαλυτή και καθαρότερη CCNA2.

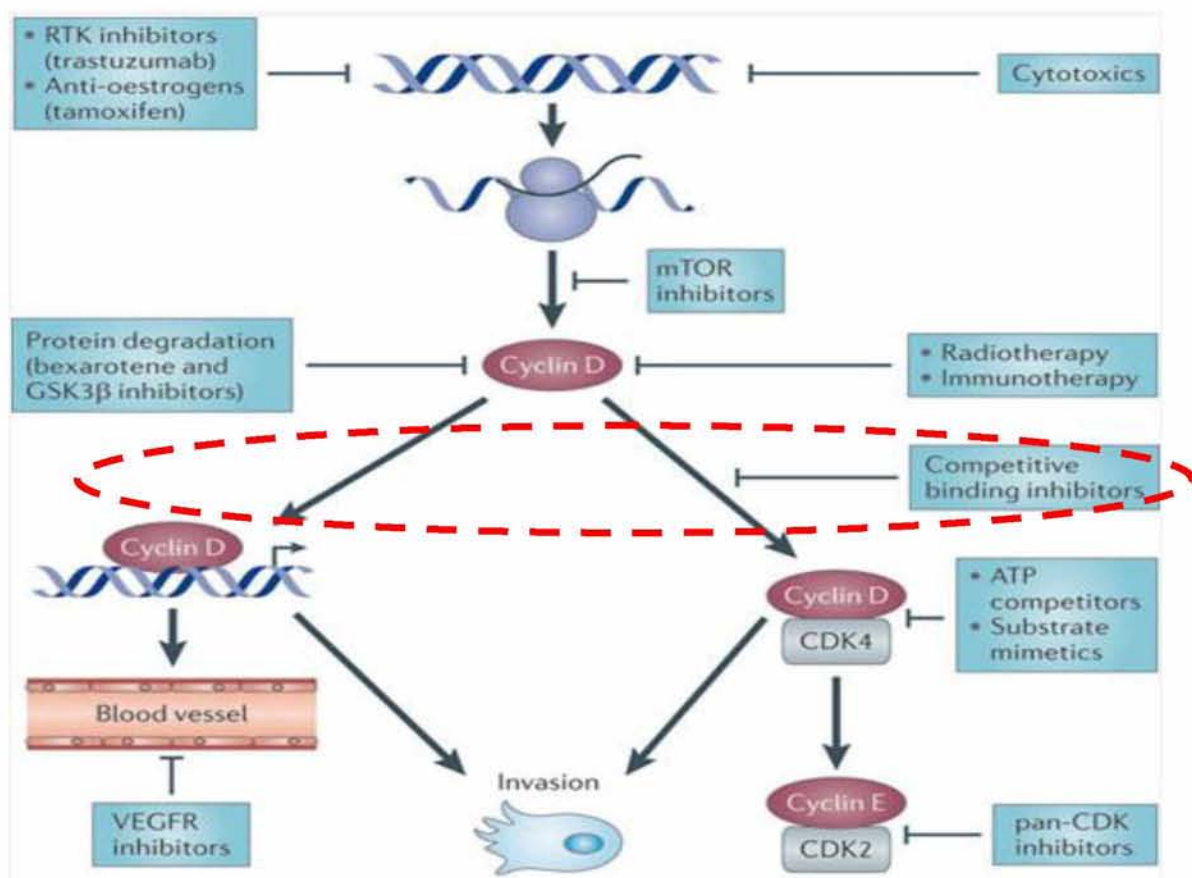


## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μέσα από την εργασία αυτή καταφέραμε την υπερ-έκφραση της ανασυνδυασμένης CCNA2 μέσω του BL21 (DE3) ως το ιδανικό στέλεχος για την πρωτεΐνη μας και με τις βέλτιστες συνθήκες να προσδιορίζονται με 0.1 mM IPTG με την επαγωγή να γίνεται στους 20°C για 12h. Η ανάκτηση της πρωτεΐνης, μέσω ομογενοποίησης, από τα σωματίδια εγκλεισμού αυξάνεται και προτιμάται από το sonication. Μετά από την εξαγωγή από τα σωματίδια εγκλεισμού, η αποδιατεταγμένη πρωτεΐνη έπρεπε να αναδιπλωθεί. Από την εξέταση των ρυθμιστικών διαλυμάτων για την μετέπειτα αναδίπλωση της CCNA2 καταλήξαμε σε αυτό που περιέχει 50 mM MES pH 6, 240 mM NaCl, 10 mM KCl, 1mM EDTA, 0.5 M arginine, 0.4 M Sucrose, 0.5% Triton X-100, 0.05% polyethylene glycol 3550 , 1 mM GSH, 0.1 mM GSSH. Για την παραμονή της CCNA2 σε σταθερή και διαλυτή μορφή, είναι απαραίτητη η αυξανόμενη συγκέντρωση  $MgCl_2$  στο διάλυμα. Η διαλυτή και αδιάλυτη μορφή (από τα inclusion bodies) της ανασυνδυασμένης CCNA2, μετρήθηκαν για την ενεργότητά τους με τους ήδη συντιθεμένους ligands, όπως αυτοί σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα **REPLACE**, δίνονται πολύ ενθαρρυντικά και υποσχόμενα αποτελέσματα για την μέθοδο, εμφανίζοντας την ενέργεια δέσμευσης σε πολλά από τα συντιθέμενα πεπτίδια να συγκλίνουν στη ζητούμενη τιμή  $K_d$  για την συγγένεια σύνδεσης στη CBG περιοχή.

Γίνεται κατανοητό πως για την εύρεση αντικαρκινικών στόχων, εργαστήρια και φαρμακοβιομηχανίες σε όλο τον κόσμο αγωνίζονται για την αναζήτηση εκείνων των σταθερών, διαλυτών και λειτουργικών πρωτεϊνών που θα οδηγήσουν στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων. Ένα

τέτοιος στόχος είναι και οι κυκλίνες μαζί με τις εξαρτώμενες από τις κυκλίνες κινάσες τους. Η εμπλοκή τους σε σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια που μπορούν προωθήσουν την αύξηση και τον πολλαπλασιασμό, έστρεψε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας και προς αυτό το κομμάτι, καθώς είναι έντονη η αναζήτηση όλο και περισσότερων αναστολέων για αυτές τις διαδικασίες, καθ' όλο το μήκος αυτών των μονοπατιών.



Εικόνα 35. Η περιοχή που περιλαμβάνει το κόκκινο, είναι η θεραπευτική προσέγγιση για τις κυκλίνες με την αναστολή τους. Αποτελεί και το στόχο του σχεδιασμού των αναστολέων μέσω του REPLACE

Για την μελέτη όμως των αναστολέων αυτών, όπως αναφέρθηκε, οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες στόχοι πρέπει να εκφραστούν μέσα από κατάλληλους φορείς. Τα βακτηριακά συστημάτων, παρέχουν μια άμεση

οδό για έρευνα των πρωτεϊνών αυτών με πιθανούς τους αναστολείς ή πιθανούς ενεργοποιητές τους. Οι κυκλίνες μαζί με τις εξαρτώμενες από τις κυκλίνες κινάσες τους ανήκουν στη πρώτη κατηγορία μελέτης, ωστόσο, η απουσία μέτα-μεταγραφικών ρυθμιστών στα προκαρυωτικά συστήματα, μπορεί να δώσουν της πρωτεΐνες που δεν μπορούν να αναδιπλωθούν και έτσι παραμένουν ανενεργές. Το πρόβλημα επιτείνεται μέσω της δημιουργίας σωματιδίων εγκλεισμού. Αυτό έχει ως συνέπεια και την αποδιάταξη της λειτουργικής δομής της πρωτεΐνης. Η επεξεργασία για την επαναδιάταξη, μπορεί να δημιουργήσει μη καλά διαμορφωμένη πρωτεΐνη ή ακόμη καθόλου αναδιαμορφωμένη πρωτεΐνη. Είναι σημαντικό λοιπόν να αναζητείται η σωστά αναδιπλωμένη μορφή και να ελέγχεται η ενεργότητα του προϊόντος έκφρασης. Το υψηλό επίπεδο καθαρισμού και ενεργότητας του προϊόντος, μπορεί να δώσει σημαντικά στοιχεία για την συνδεσιμότητα και να αναγνωριστεί πιθανός αναστολέας, τέτοιος ώστε να μελετηθεί περαιτέρω η διαλυτότητά του σε *in vivo* συνθήκες.

Καθώς το κόστος είναι σημαντικός παράγοντας σε όλα τα στάδια της έρευνας, στρατηγικές όπως η ανάλυση μέσω του προγράμματος REPLACE, δίνει εκείνα τα πλεονεκτήματα, συγκεκριμενοποίησης της ζητούμενης δομής του αναστολέα για την στοχευμένη ανάπτυξη φαρμακευτικών ουσιών, όπως ο αντικαρκινικός στόχος στη θέση σύνδεσης της Cyclin A – CDK2. Η δημιουργία των ανάλογων αναστολέων με τη μέθοδο αυτή, προάγει τη σύνθεση όλο και πιο κατάλληλων ως προς τη δομή αλλά και πιο ισχυρών ως προς τη σχέση σύνδεσης με το στόχο (CBG), πεπτιδίων που μπορεί να οδηγήσουν ακόμη και σε εξατομικευμένη θεραπεία στο μέλλον.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

| Vector          | amp <sup>r</sup> | kan <sup>r</sup> | T7 | T7/lac | His•Tag <sup>*</sup> | T7•Tag <sup>11</sup> | S•Tag <sup>TM</sup> | CBD•Tag <sup>TM</sup> | HSV•Tag <sup>*</sup> | Dsb•Tag <sup>TM</sup> | Nus•Tag <sup>TM</sup> | signal seq. |
|-----------------|------------------|------------------|----|--------|----------------------|----------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------|
|                 |                  |                  |    |        |                      |                      |                     |                       |                      |                       |                       | protease    |
| pET-3a-d        | •                |                  | •  |        |                      | N                    |                     |                       |                      |                       |                       |             |
| pET-9a-d        |                  | •                | •  |        |                      | N                    |                     |                       |                      |                       |                       |             |
| pET-11a-d       | •                |                  | •  |        |                      | N                    |                     |                       |                      |                       |                       |             |
| pET-12a-c       | •                |                  | •  |        |                      |                      |                     |                       |                      |                       |                       | •           |
| pET-14b         | •                |                  | •  |        | N                    |                      |                     |                       |                      |                       |                       | T           |
| pET-15b         | •                |                  |    | •      | N                    |                      |                     |                       |                      |                       |                       | T           |
| pET-16b         | •                |                  |    | •      | N                    |                      |                     |                       |                      |                       |                       | X           |
| pET-17b         | •                |                  | •  |        |                      | N                    |                     |                       |                      |                       |                       |             |
| pET-17xb        | •                |                  | •  |        |                      | N                    |                     |                       |                      |                       |                       |             |
| pET-19b         | •                |                  |    | •      | N                    |                      |                     |                       |                      |                       |                       | E           |
| pET-20b(+)      | •                |                  | •  |        | C                    |                      |                     |                       |                      |                       |                       | •           |
| pET-21a-d(+)    | •                |                  |    | •      | C                    | N                    |                     |                       |                      |                       |                       | •           |
| pET-22b(+)      | •                |                  |    | •      | C                    |                      |                     |                       |                      |                       |                       | •           |
| pET-23a-d(+)    | •                |                  | •  |        | C                    | N                    |                     |                       |                      |                       |                       |             |
| pET-24a-d(+)    |                  | •                |    | •      | C                    | N                    |                     |                       |                      |                       |                       |             |
| pET-25b(+)      | •                |                  |    | •      | C                    |                      |                     |                       | C                    |                       |                       | •           |
| pET-26b(+)      |                  | •                |    | •      | C                    |                      |                     |                       |                      |                       |                       | •           |
| pET-27b(+)      |                  | •                |    | •      | C                    |                      |                     |                       | C                    |                       |                       | •           |
| pET-28a-c(+)    | •                |                  | •  |        | N,C                  | I                    |                     |                       |                      |                       |                       | T           |
| pET-29a-c(+)    | •                |                  | •  |        | C                    |                      | N                   |                       |                      |                       |                       | T           |
| pET-30a-c(+)    | •                |                  | •  |        | N,C                  |                      | I                   |                       |                      |                       |                       | T,E         |
| pET-30 Ek/LIC   |                  | •                |    | •      | N,C                  |                      | I                   |                       |                      |                       |                       | T,E         |
| pET-30 Xa/LIC   |                  | •                |    | •      | N,C                  |                      | I                   |                       |                      |                       |                       | T,X         |
| pET-31b(+)      | •                |                  |    | •      | C                    |                      |                     | N                     |                      |                       |                       |             |
| pET-32a-c(+)    | •                |                  |    | •      | I,C                  |                      | I                   | N                     |                      |                       |                       | T,E         |
| pET-32 Ek/LIC   | •                |                  |    | •      | I,C                  |                      | I                   | N                     |                      |                       |                       | T,E         |
| pET-32 Xa/LIC   | •                |                  |    | •      | I,C                  |                      | I                   | N                     |                      |                       |                       | T,X         |
| pET-33b(+)      |                  | •                |    | •      | N,C                  | I                    |                     |                       |                      | I                     |                       | T           |
| pET-34b(+)      |                  | •                |    | •      | C                    |                      | I                   | N                     |                      |                       |                       | T,E         |
| pET-35b(+)      |                  | •                |    | •      | C                    |                      | I                   | N                     |                      |                       |                       | T,X         |
| pET-36b(+)      |                  | •                |    | •      | C                    |                      | I                   | N                     |                      |                       |                       | T,E         |
| pET-37b(+)      |                  | •                |    | •      | C                    |                      | I                   | N                     |                      |                       |                       | T,X         |
| pET-38b(+)      |                  | •                |    | •      | C                    |                      | I                   | C                     |                      |                       |                       | T           |
| pET-39b(+)      |                  | •                |    | •      | I,C                  |                      | I                   |                       |                      | N                     |                       | T,E         |
| pET-40b(+)      |                  | •                |    | •      | I,C                  |                      | I                   |                       |                      | N                     |                       | T,E         |
| pET-41a-c(+)    |                  | •                |    | •      | I,C                  |                      | I                   |                       |                      |                       | N                     | T,E         |
| pET-41 Ek/LIC   |                  | •                |    | •      | I,C                  |                      | I                   |                       |                      |                       | N                     | T,E         |
| pET-42a-c(+)    |                  | •                |    | •      | I,C                  |                      | I                   |                       |                      |                       | N                     | T,X         |
| pET-43.1a-c(+)  | •                |                  |    | •      | I,C                  |                      | I                   |                       | C                    |                       | N                     | T,E         |
| pET-43.1 Ek/LIC | •                |                  |    | •      | I,C                  |                      | I                   |                       | C                    |                       | N                     | T,E         |
| pET-44a-c(+)    | •                |                  |    | •      | N,I,C                |                      | I                   |                       | C                    |                       | I                     | T,E         |
| Vector          | amp <sup>r</sup> | kan <sup>r</sup> | T7 | T7/lac | His•Tag              | T7•Tag <sup>11</sup> | S•Tag               | CBD•Tag               | HSV•Tag              | Dsb•Tag               | Nus•Tag               | signal seq. |
|                 |                  |                  |    |        |                      |                      |                     |                       |                      |                       |                       | protease    |

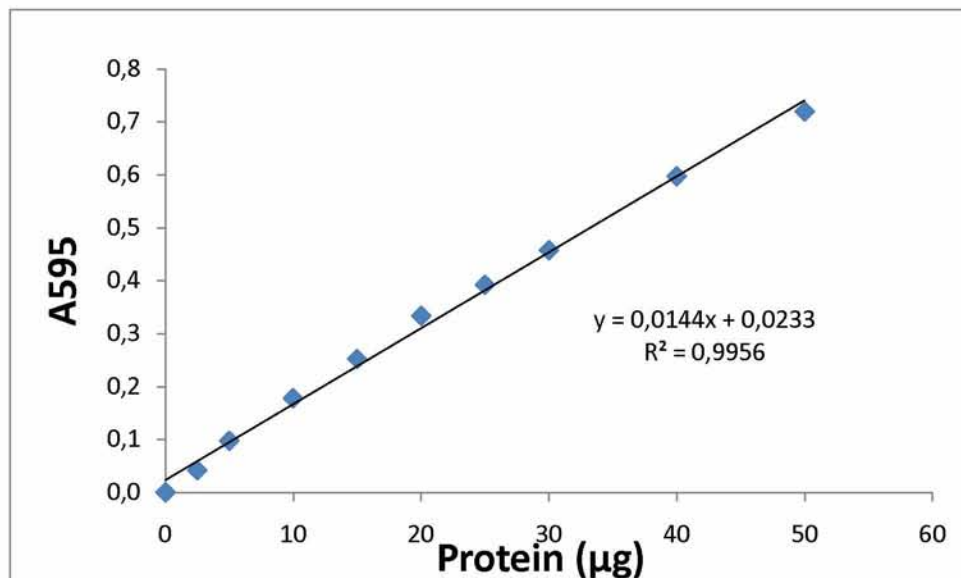
Notes: T7•Tag<sup>11</sup> = 11 aa fusion tag T7•Tag<sup>260</sup> = 260 aa fusion tag  
 signal seq. = signal sequence for potential periplasmic localization  
 I = internal tag N = N-terminal tag C = optional C-terminal tag  
 protease cleavage sites: T = thrombin E = enterokinase X = Factor Xa  
 LIC = ligation-independent cloning

Εικόνα Π-1. Η επιλογή του pET16b. Συγκριτικά χαρακτηριστικά.



| Strain                       | Deriv. | Genotype  | Description/Application   | Antibiotic Resistance <sup>1</sup>                      |
|------------------------------|--------|---|---|---|
| AD494                        | K-12   | $\Delta ara-leu7697 \Delta lacX74 \Delta phoAPvuII phoR \Delta malF3$<br>$F'[lac'(lacI^*)pro] trxB::kan$            | <i>trxB</i> non-expression <sup>†</sup> host; allows disulfide bond formation in <i>E. coli</i> cytoplasm                                 | Kanamycin (15 µg/ml)                                    |
| AD494(DE3)                   | K-12   | $\Delta ara-leu7697 \Delta lacX74 \Delta phoAPvuII phoR \Delta malF3$<br>$F'[lac'(lacI^*)pro] trxB::kan(DE3)$       | <i>trxB</i> expression <sup>†</sup> host; allows disulfide bond formation in <i>E. coli</i> cytoplasm                                     | Kanamycin (15 µg/ml)                                    |
| AD494(DE3)pLysS              | K-12   | $\Delta ara-leu7697 \Delta lacX74 \Delta phoAPvuII phoR \Delta malF3$<br>$F'[lac'(lacI^*)pro] trxB::kan(DE3) pLysS$ | <i>trxB</i> high-stringency <sup>AA</sup> expression host; allows disulfide bond formation in <i>E. coli</i> cytoplasm                    | Kanamycin (15 µg/ml)<br>Chloramphenicol (34 µg/ml)      |
| B834                         | B      | $F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm met$  | <i>met</i> auxotroph, parent of BL21, control non-expression <sup>†</sup> host  | none  |
| B834(DE3)                    | B      | $F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm met (DE3)$  | <i>met</i> auxotroph parent of BL21, general expression <sup>†</sup> host, <sup>35</sup> S-met labeling                                   | none  |
| B834(DE3)pLysS               | B      | $F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm met (DE3) pLysS$  | <i>met</i> auxotroph, parent of BL21, high-stringency expression <sup>AA</sup> host, <sup>35</sup> S-met labeling                         | Chloramphenicol (34 µg/ml)                              |
| BL21                         | B      | $F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm$  | control non-expression <sup>†</sup> host  | none  |
| BL21(DE3)                    | B      | $F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm (DE3)$  | general purpose expression <sup>†</sup> host  | none  |
| BL21(DE3)pLysS               | B      | $F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm (DE3) pLysS (Cm^R)$   | high-stringency <sup>AA</sup> expression host   | Chloramphenicol (34 µg/ml)                              |
| BL21 <trxb>(DE3)</trxb>      | B      | $F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm trxB15::kan (DE3)$  | general expression <sup>†</sup> host; allows disulfide bond formation in <i>E. coli</i> cytoplasm   | Kanamycin (15 µg/ml)                                    |
| BL21 <trxb>(DE3)pLysS</trxb> | B      | $F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm trxB15::kan (DE3) pLysS (Cm^R)$   | high-stringency <sup>AA</sup> expression host; allows disulfide bond formation in <i>E. coli</i> cytoplasm                                | Kanamycin (15 µg/ml)<br>Chloramphenicol (34 µg/ml)      |
| BLR                          | B      | $F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm \Delta (srI-recA)306::Tn10 (Tc^R)$  | <i>recA</i> non-expression <sup>†</sup> host recommended for use with tandem repeats  | Tetracycline (12.5 µg/ml)                               |
| BLR(DE3)                     | B      | $F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm \Delta (srI-recA)306::Tn10 (Tc^R) (DE3)$                                      | <i>recA</i> expression <sup>†</sup> host recommended for use with tandem repeats  | Tetracycline (12.5 µg/ml)                               |
| BLR(DE3)pLysS                | B      | $F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm \Delta (srI-recA)306::Tn10 (DE3) pLysS$                                       | <i>recA</i> high-stringency <sup>AA</sup> expression host recommended for use with tandem repeats   | Chloramphenicol (34 µg/ml)<br>Tetracycline (12.5 µg/ml) |
| HMS174                       | K-12   | $F^- recA1 hsdR(r_{K12}^- m_{K12}^-) Rif^R$   | control non-expression <sup>†</sup> host  | Rifampicin (200 µg/ml)                                  |
| HMS174(DE3)                  | K-12   | $F^- recA1 hsdR(r_{K12}^- m_{K12}^-) Rif^R (DE3)$   | <i>recA</i> K-12 expression <sup>†</sup> host   | Rifampicin(200 µg/ml)                                   |
| HMS174(DE3)pLysS             | K-12   | $F^- recA1 hsdR(r_{K12}^- m_{K12}^-) Rif^R (DE3) pLysS$   | <i>recA</i> K-12 high-stringency <sup>AA</sup> expression host  | Chloramphenicol (34 µg/ml)<br>Rifampicin (200 µg/ml)    |
| Rosetta™                     | B      | $F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm lacY1 pRARE^R (Cm^R)$   | control non-expression <sup>†</sup> host  | Chloramphenicol (34 µg/ml)                              |
| Rosetta(DE3)                 | B      | $F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm lacY1 (DE3) pRARE^R (Cm^R)$   | general expression <sup>†</sup> host; <i>lac</i> permease mutation allows control of expression level, provides rare codon tRNAs          | Chloramphenicol (34 µg/ml)                              |
| Rosetta(DE3)pLysS            | B      | $F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm lacY1 (DE3) pLysSRARE^R (Cm^R)$   | high-stringency <sup>AA</sup> expression host; <i>lac</i> permease mutation allows control of expression level, provides rare codon tRNAs | Chloramphenicol (34 µg/ml)                              |

**Εικόνα Π-2. Συγκριτικά χαρακτηριστικά διαφόρων στελεχών**



**Εικόνα Π-3. Η πρότυπη καμπύλη BSA για τον υπολογισμό της ποσότητας της πρωτεΐνης μέσω BRADFORD**

The input sequence has a 18.4 percent chance of solubility when overexpressed in E. Coli.

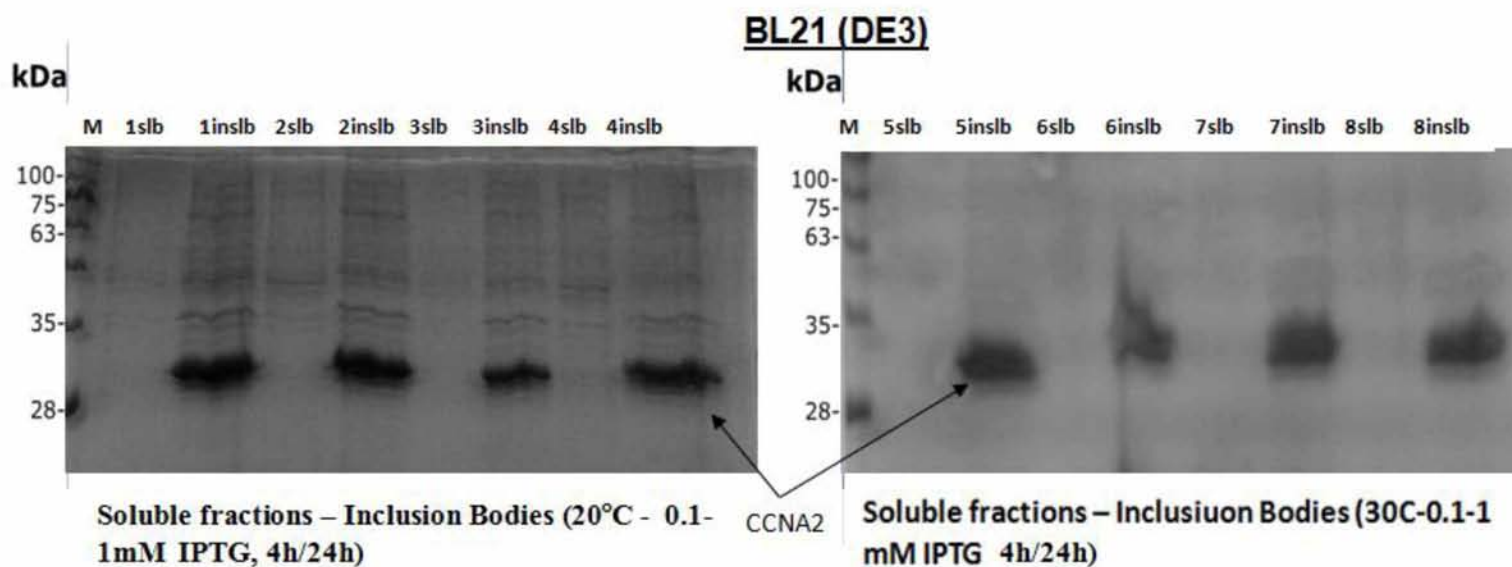
The amino acid composition of the input sequence is:

```

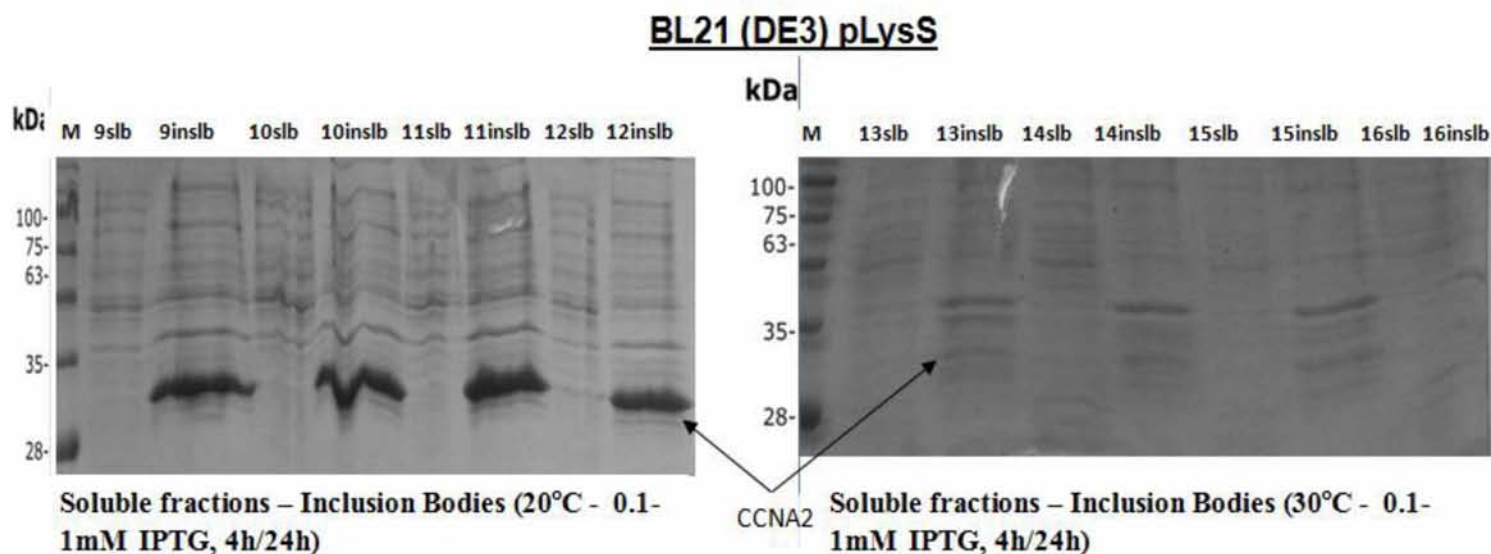
17 Alanine (A)
7 Arginine (R)
11 Aspartate (D)
8 Asparagine (N)
3 Cysteine (C)
13 Glutamine (Q)
19 Glutamate (E)
9 Glycine (G)
9 Histidine (H)
10 Isoleucine (I)
37 Leucine (L)
19 Lysine (K)
8 Methionine (M)
8 Phenylalanine (F)
14 Proline (P)
14 Serine (S)
16 Threonine (T)
2 Tryptophan (W)
16 Tyrosine (Y)
19 Valine (V)

```

**Εικόνα Π-4. Η εκτίμηση του λογισμικού προγράμματος για τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης αμέσως μετά την υπερ-έκφραση.**

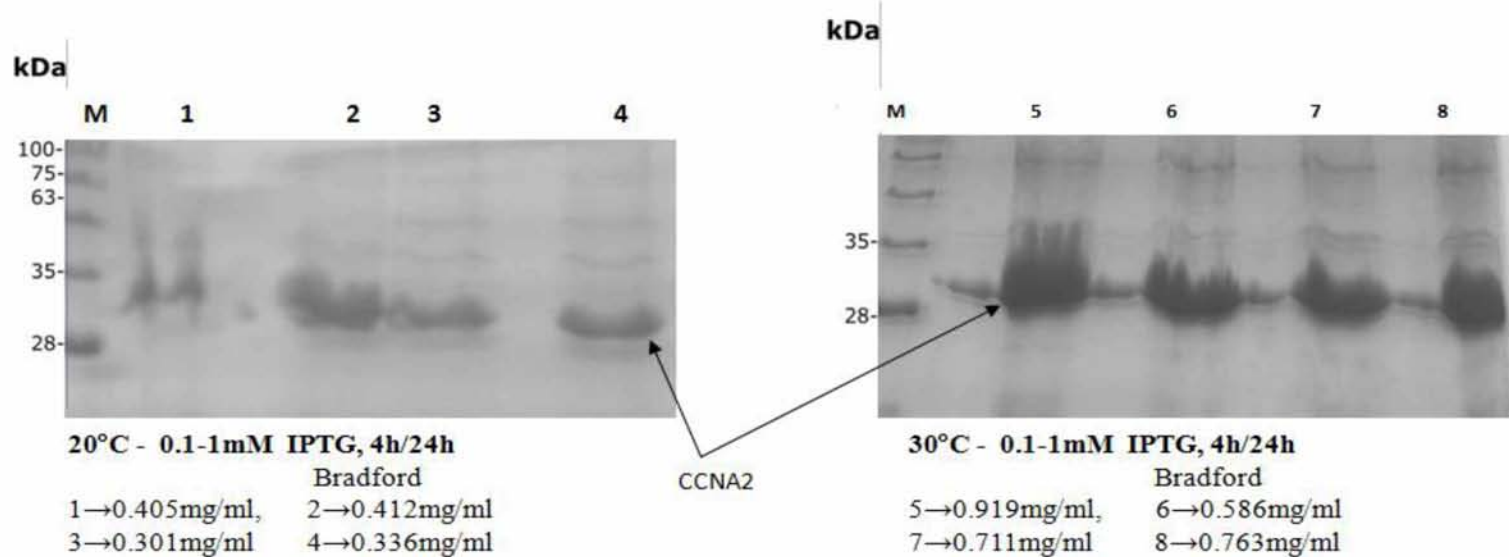


*Εικόνα Π-5. Η ανάλυση των κλασμάτων διαλυτού (Soluble, slb) και αδιάλυτου (Insoluble, inslb) μετά την εφαρμογή υπερήχων για τη λύση των κυττάρων, από τον κεντρικό πειραματικό σχεδιασμό.*



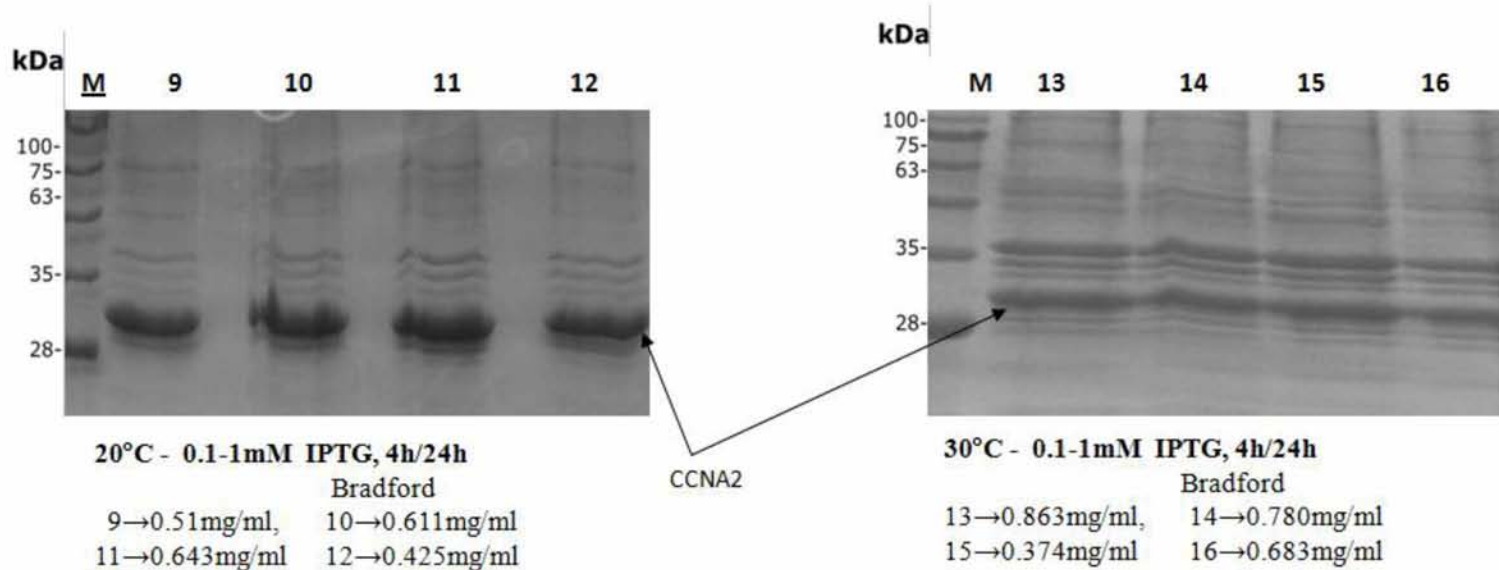


## BL21 (DE3)

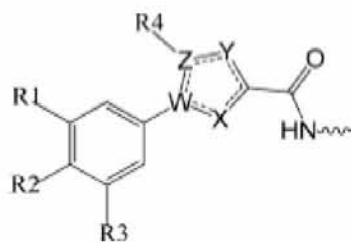


*Εικόνα Π-6. Η ανάλυση ποιοτική και ποσοτική του διαλυτού (Soluble) κλάσματος της πρωτεΐνης μετά την ανάκτηση από τα σωματίδια εγκλεισμού. Η εκτίμηση της ολικής ποσότητας της πρωτεΐνης για κάθε δείγμα έγινε μέσω της μεθόδου Bradford.*

## BL21 (DE3) pLysS



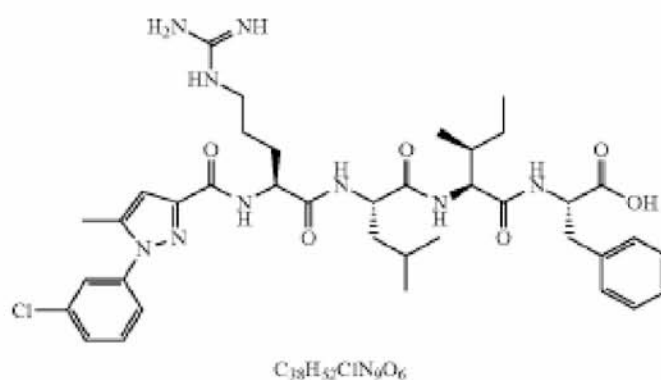




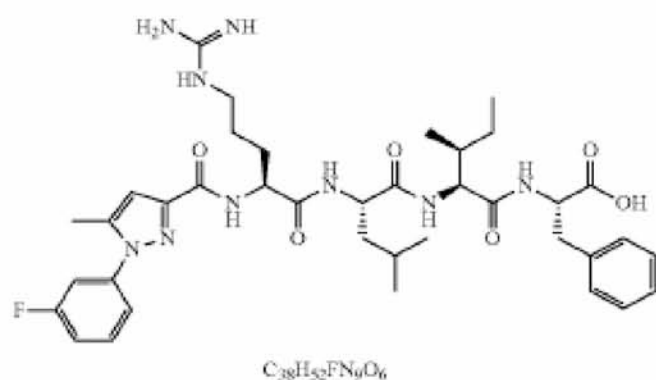
| SCCP ID   | R1               | R2               | R3 | R4              | W | X | Y | Z | CDK2/cyclin A IC <sub>50</sub> (μM) | CDK4/cyclin D1 IC <sub>50</sub> (μM) |
|-----------|------------------|------------------|----|-----------------|---|---|---|---|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Triazole  |                  |                  |    |                 |   |   |   |   |                                     |                                      |
| 5843      | H                | H                | H  | H               | N | N | N | C | 16.2 ± 3                            | 49.2 ± 7.60                          |
| 5773      | Cl               | H                | Cl | CH <sub>3</sub> | N | N | N | C | 4.0 ± 0.6                           | 27.3 ± 3.40                          |
| 5774      | H                | Cl               | H  | CH <sub>3</sub> | N | N | N | C | 11.5 ± 3.3                          | 12.0 ± 2.06                          |
| 5906      | Cl               | H                | H  | CH <sub>3</sub> | N | N | N | C | 5.7 ± 0.99                          | 26.5 ± 7.49                          |
| 5907      | CH <sub>3</sub>  | H                | H  | CH <sub>3</sub> | N | N | N | C | 13.8 ± 1.13                         | 51.05 ± 16.05                        |
| Pyrazole  |                  |                  |    |                 |   |   |   |   |                                     |                                      |
| 5762      | H                | H                | H  | CH <sub>3</sub> | N | N | C | C | 40.3 ± 6.5                          | 54.2 ± 3.05                          |
| 5763      | Cl               | H                | Cl | CH <sub>3</sub> | N | N | C | C | 21.8 ± 13.7                         | >100                                 |
| 5764      | Cl               | H                | H  | CH <sub>3</sub> | N | N | C | C | 11.9 ± 2.0                          | 70.3 ± 12.79                         |
| 5771      | F                | H                | H  | CH <sub>3</sub> | N | N | C | C | 29.6 ± 12.2                         | 65.9 ± 6.60                          |
| 5765      | H                | Cl               | H  | CH <sub>3</sub> | N | N | C | C | 33.7 ± 8.1                          | 54.7 ± 20.43                         |
| 5766      | OCH <sub>3</sub> | H                | H  | CH <sub>3</sub> | N | N | C | C | 64.1 ± 4.2                          | >100                                 |
| 5767      | H                | OCH <sub>3</sub> | H  | CH <sub>3</sub> | N | N | C | C | >180                                | >180                                 |
| Pyrrrole  |                  |                  |    |                 |   |   |   |   |                                     |                                      |
| 5776      | H                | Cl               | H  | H               | N | C | C | C | >180                                | >180                                 |
| 5775      | Cl               | H                | Cl | H               | N | C | C | C | >180                                | >180                                 |
| Furan     |                  |                  |    |                 |   |   |   |   |                                     |                                      |
| 5768      | Cl               | H                | Cl | H               | C | O | C | C | >180                                | >180                                 |
| 5769      | Cl               | H                | H  | H               | C | O | C | C | >180                                | >180                                 |
| Imidazole |                  |                  |    |                 |   |   |   |   |                                     |                                      |
| 5760      | H                | H                | H  | CH <sub>3</sub> | C | N | C | N | >180                                | >180                                 |
| 5852      | F                | H                | H  | H               | C | N | C | N | 34.3 ± 0.6                          | 68.5 ± 14.84                         |
| Thiazole  |                  |                  |    |                 |   |   |   |   |                                     |                                      |
| 5583      | H                | Cl               | H  | H               | C | N | C | S | >180                                | >180                                 |

**Εικόνα Π-7. Χαρακτηριστικά μερικών εκ των ήδη συντιθεμένων αναστολέων της Cyclin A2**

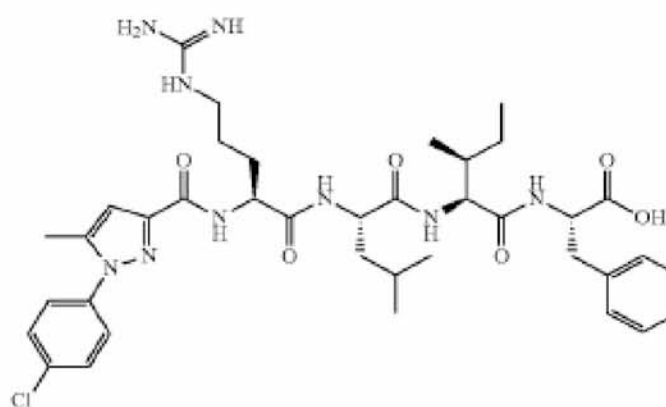
SCCP ID 5764



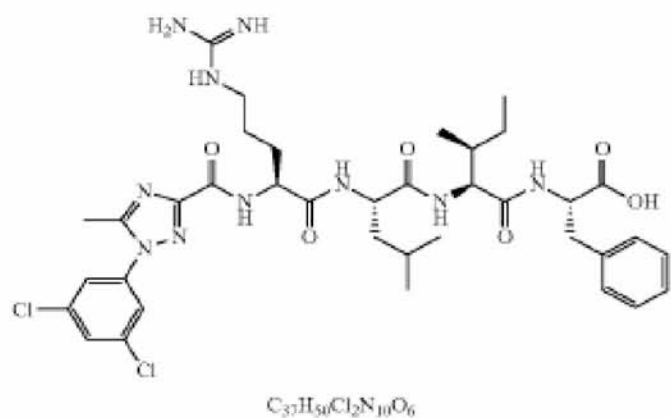
SCCP ID 5771



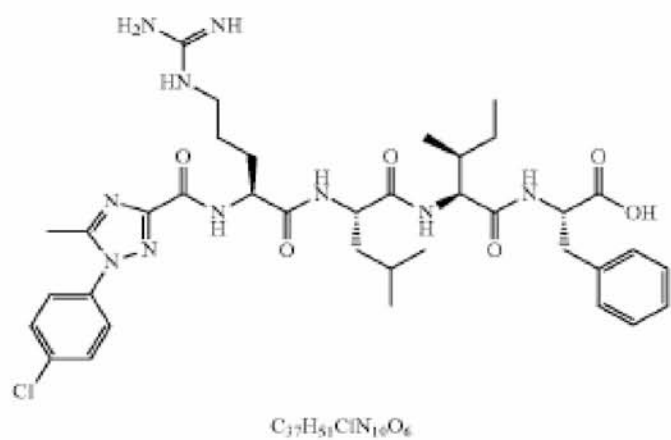
SCCP ID 5765



SCCP ID 5773



SCCP ID 5774



**Εικόνα Π-8. Πεπτιδικά ανάλογα, δυνητικές δομές πιθανών αναστολέων.**

## **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Elledge, S. J. (1996) Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis, *Science* 274, 1664-1672.
2. Morgan, D. O. (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors, *Annual review of cell and developmental biology* 13, 261-291.
3. Andrews, M. J., Kontopidis, G., McInnes, C., Plater, A., Innes, L., Cowan, A., Jewsbury, P., and Fischer, P. M. (2006) REPLACE: a strategy for iterative design of cyclin-binding groove inhibitors, *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 7, 1909-1915.
4. Satyanarayana, A., and Kaldis, P. (2009) Mammalian cell-cycle regulation: several Cdk, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms, *Oncogene* 28, 2925-2939.
5. Kontopidis, G., McInnes, C., Pandalaneni, S. R., McNae, I., Gibson, D., Mezna, M., Thomas, M., Wood, G., Wang, S., Walkinshaw, M. D., and Fischer, P. M. (2006) Differential binding of inhibitors to active and inactive CDK2 provides insights for drug design, *Chemistry & biology* 13, 201-211.
6. De Boer, L., Oakes, V., Beamish, H., Giles, N., Stevens, F., Somodevilla-Torres, M., Desouza, C., and Gabrielli, B. (2008) Cyclin A/cdk2 coordinates centrosomal and nuclear mitotic events, *Oncogene* 27, 4261-4268.
7. Harbour, J. W., and Dean, D. C. (2000) The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms, *Genes & development* 14, 2393-2409.
8. Oduro, J. D., Uecker, R., Hagemeier, C., and Wiebusch, L. (2012) Inhibition of human cytomegalovirus immediate-early gene expression by cyclin A2-dependent kinase activity, *Journal of virology* 86, 9369-9383.
9. Harris, C. C. (1996) Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies, *Journal of the National Cancer Institute* 88, 1442-1455.
10. Ilyin, G. P., Glaise, D., Gilot, D., Baffet, G., and Guguen-Guillouzo, C. (2003) Regulation and role of p21 and p27 cyclin-dependent kinase inhibitors during hepatocyte differentiation and growth, *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 285, G115-127.
11. Tian, J. Q., and Quaroni, A. (1999) Involvement of p21(WAF1/Cip1) and p27(Kip1) in intestinal epithelial cell differentiation, *The American journal of physiology* 276, C1245-1258.
12. Phizicky, E. M., and Fields, S. (1995) Protein-protein interactions: methods for detection and analysis, *Microbiological reviews* 59, 94-123.
13. Whitty, A., and Kumaravel, G. (2006) Between a rock and a hard place?, *Nature chemical biology* 2, 112-118.
14. Kontopidis, G., Andrews, M. J., McInnes, C., Cowan, A., Powers, H., Innes, L., Plater, A., Griffiths, G., Paterson, D., Zheleva, D. I., Lane, D. P., Green, S., Walkinshaw, M. D., and Fischer, P. M. (2003) Insights into cyclin groove recognition: complex crystal structures and inhibitor design through ligand exchange, *Structure* 11, 1537-1546.
15. Kosmopoulou, M. N., Leonidas, D. D., Chrysina, E. D., Bischler, N., Eisenbrand, G., Sakarellos, C. E., Pauptit, R., and Oikonomakos, N. G. (2004) Binding of the potential antitumour agent indirubin-5-sulphonate at the inhibitor site of rabbit muscle glycogen phosphorylase b. Comparison with ligand binding to pCDK2-cyclin A complex, *European journal of biochemistry / FEBS* 271, 2280-2290.

16. Liu, S., Premnath, P. N., Bolger, J. K., Perkins, T. L., Kirkland, L. O., Kontopidis, G., and McInnes, C. (2013) Optimization of non-ATP competitive CDK/cyclin groove inhibitors through REPLACE-mediated fragment assembly, *Journal of medicinal chemistry* 56, 1573-1582.
17. Castanedo, G., Clark, K., Wang, S., Tsui, V., Wong, M., Nicholas, J., Wickramasinghe, D., Marsters, J. C., Jr., and Sutherlin, D. (2006) CDK2/cyclinA inhibitors: targeting the cyclinA recruitment site with small molecules derived from peptide leads, *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 16, 1716-1720.
18. Hayes, J. M., and Leonidas, D. D. (2010) Computation as a tool for glycogen phosphorylase inhibitor design, *Mini reviews in medicinal chemistry* 10, 1156-1174.
19. Vulpetti, A., and Pevarello, P. (2005) An analysis of the binding modes of ATP-competitive CDK2 inhibitors as revealed by X-ray structures of protein-inhibitor complexes, *Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents* 5, 561-573.
20. Russo, A. A., Jeffrey, P. D., Patten, A. K., Massague, J., and Pavletich, N. P. (1996) Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex, *Nature* 382, 325-331.
21. Papaneophytou, C. P., and Kontopidis, G. A. (2012) Optimization of TNF-alpha overexpression in Escherichia coli using response surface methodology: Purification of the protein and oligomerization studies, *Protein expression and purification* 86, 35-44.
22. Papaneophytou, C. P., Rinotas, V., Douni, E., and Kontopidis, G. (2013) A statistical approach for optimization of RANKL overexpression in Escherichia coli: purification and characterization of the protein, *Protein expression and purification* 90, 9-19.
23. Papaneophytou, C. P., and Kontopidis, G. (2014) Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in Escherichia coli: a general review, *Protein expression and purification* 94, 22-32.
24. Singh, S. M., and Panda, A. K. (2005) Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins, *Journal of bioscience and bioengineering* 99, 303-310.
25. Mandel, M., and Higa, A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection, *Journal of molecular biology* 53, 159-162.
26. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry* 72, 248-254.
27. Bearden, J. C., Jr. (1978) Quantitation of submicrogram quantities of protein by an improved protein-dye binding assay, *Biochimica et biophysica acta* 533, 525-529.
28. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685.
29. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4350-4354.
30. Chou, C. P. (2007) Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in Escherichia coli, *Applied microbiology and biotechnology* 76, 521-532.
31. Makrides, S. C. (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli, *Microbiological reviews* 60, 512-538.
32. Baneyx, F. (1999) Recombinant protein expression in Escherichia coli, *Current opinion in biotechnology* 10, 411-421.
33. Sorensen, H. P., and Mortensen, K. K. (2005) Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of Escherichia coli, *Microbial cell factories* 4, 1.
34. Villaverde, A., and Carrio, M. M. (2003) Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies, *Biotechnology letters* 25, 1385-1395.

35. Vallejo, L. F., and Rinas, U. (2004) Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins, *Microbial cell factories* 3, 11.
36. Mayer, M., and Buchner, J. (2004) Refolding of inclusion body proteins, *Methods in molecular medicine* 94, 239-254.
37. Mechin, V., Damerval, C., and Zivy, M. (2007) Total protein extraction with TCA-acetone, *Methods Mol Biol* 355, 1-8.
38. Prystay, L., Gosselin, M., and Banks, P. (2001) Determination of equilibrium dissociation constants in fluorescence polarization, *Journal of biomolecular screening* 6, 141-150.
39. Liu, S., Bolger, J. K., Kirkland, L. O., Premnath, P. N., and McInnes, C. (2010) Structural and functional analysis of cyclin D1 reveals p27 and substrate inhibitor binding requirements, *ACS chemical biology* 5, 1169-1182.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΕΙΚΟΝΩΝ**

### **Εικόνα 1**

<http://gleesonbiology.pbworks.com/f/1159269703/Cell%20cycle%20check%20points.jpg>

### **Εικόνα 2**

[http://en.wikipedia.org/wiki/File:Cyclin\\_Expression.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Cyclin_Expression.svg)

### **Εικόνα 3**

<http://studentreader.com/mitosis-factors-cyclin-cdks>

### **Εικόνα 4**

<http://www.nature.com/onc/journal/v28/n33/images/onc2009170f1.jpg>

### **Εικόνα 5**

[http://php.med.unsw.edu.au/cellbiology/images/thumb/9/94/ZCyclin\\_D\\_structure.JPG/200px-ZCyclin\\_D\\_structure.JPG](http://php.med.unsw.edu.au/cellbiology/images/thumb/9/94/ZCyclin_D_structure.JPG/200px-ZCyclin_D_structure.JPG)

### **Εικόνα 6**

[http://en.wikipedia.org/wiki/File:Regulation\\_of\\_cell\\_cycle.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Regulation_of_cell_cycle.png)

### **Εικόνα 7**

Structure of the CCNA2 protein. Based on [PyMOL](#) rendering of PDB [1e9h](#),  
[http://en.wikipedia.org/wiki/File:Protein\\_CCNA2\\_PDB\\_1e9h.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Protein_CCNA2_PDB_1e9h.png)

### **Εικόνα 8**

<http://www.albertcheng.info/MotifMarker.htm>

### **Εικόνα 9**

<http://ajpgi.physiology.org/content/285/1/G115>

### **Εικόνα 13**

<http://biochem.web.utah.edu/hill/links/pET16b.pdf>

### **Εικόνα 15**

<http://oasys2.confex.com/acs/238nm/techprogram/images/1293576-0.gif>

### **Εικόνα 19**

<http://www.qiagen.com/knowledge-and-support/spotlight/plasmid-resource-center/growth%20of%20bacterial%20cultures/>

### **Εικόνα 20**

<http://www.mikeblaber.org/oldwine/BCH4053I/Lecture07/Lecture07.htm>